

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
MARCEL KOFFI KOUASSI

COMPORTEMENT ET ACTIVITE LARVICIDE DE BACILLUS
THURINGIENSIS SEROVARIETE ISRAELENIS DANS UN COURS D'EAU

DECEMBRE 1987

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RESUME

Les cristaux protéiques produits lors de la sporulation de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis (B.t.i.) sont toxiques pour les simules et certains moustiques. Appliqué comme insecticide en milieu aquatique, il est efficace et sélectif, mais son dosage dans les eaux naturelles pose un problème; particulièrement à des concentrations sublétales, car on ne peut le doser que par des tests biologiques, contrairement aux insecticides chimiques. Afin de circonvenir ce problème, nous avons mis au point avec l'aide d'un appareil PELLICON, une méthodologie qui permet de concentrer la fraction active de B.t.i. présente dans les échantillons d'eau, jusqu'à un niveau dosable par un test biologique conventionnel.

Suite aux travaux de laboratoire, nous avons effectué des expériences de terrain dans le but d'étudier le transport de B.t.i. en eau courante et d'appliquer aux échantillons recueillis la technique mise au point.

Nous avons choisi pour notre étude la rivière aux BETES PUANTES et un ruisseau du petit lac FRASER situés dans la réserve Saint-Maurice. Les expériences ont consisté dans une première étape à effectuer un traçage à la rhodamine pour déterminer les paramètres de transport (vitesse de

déplacement, dispersion et perte du produit) et ce, basé sur l'analyse des échantillons recueillis à différentes stations en aval du point d'épandage.

Dans une seconde étape, un traçage au B.t.i. a été effectué dans les mêmes conditions que la rhodamine.

L'analyse des résultats obtenues a révélé d'une part que dans le ruisseau du petit lac FRASER, la baisse de concentration (rhodamine et B.t.i.) d'une station à l'autre était beaucoup plus importante que dans la rivière aux BETES PUANTES. D'autre part, l'analyse des concentrations en B.t.i. dans les eaux avant et après ultrafiltration a montré que le pourcentage de récupération de la fraction toxique était en général élevé.

La plus grande perte de B.t.i. enregistrée dans le ruisseau du petit lac FRASER indique une longueur de perte dont la distance (en mètre) est moins élevée dans les petits cours d'eau que dans les grands (802 m pour la rivière aux BETES PUANTES et 210 m pour le ruisseau du petit lac FRASER).

L'utilisation de la technique d'ultrafiltration tangentielle a permis le dosage de B.t.i. en concentration sublétales dans les eaux naturelles et a démontré son utilité pour l'étude du transport de cet insecticide en rivière.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherche le Docteur Jacques Boisvert pour le rôle prépondérant qu'il a joué dans ma formation scientifique. L'ampleur de ses connaissances et la qualité de ses conseils m'ont permis de réaliser ce projet. Je le remercie pour la confiance qu'il a témoignée à mon égard, et pour son aide financière durant ces deux années.

Je voudrais remercier tout spécialement Messieurs Christian Back et Alain Chalifour qui m'ont si aimablement et si judicieusement conseillé pour l'analyse statistique des résultats, et m'ont initié à l'informatique. Leur inlassable soutien et leur aide efficace m'ont été infiniment précieux.

Au cours de ces travaux j'ai eu à apprécier la disponibilité du Docteur Guy Charpentier. Je tiens à lui adresser mes vifs remerciements pour les encouragements qu'il m'a prodigués.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Gilles Proteau de la Réserve Saint-Maurice et la compagnie Zoecon Ltd. (CANADA), pour son aide financière durant ce travail.

Mes remerciements vont enfin à tous ceux qui m'apportèrent leur inestimable collaboration, et notamment:

- aux professionnelles de recherche Mmes Chantal Alarie et Liette Laganière,

- à mes collègues Mario Boisvert et Claude Dupont.

TABLE DES MATIERES

	Page
PAGE TITRE	i
RESUME	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABREVIATIONS	xv
 CHAPITRES	
I. INTRODUCTION	1
I.1 Connaissances actuelles sur le B.t.	1
I.2 Etude des facteurs conditionnant	
l'efficacité de B.t.i. contre les simuliés.	8
I.2.1 Etudes en laboratoire	8
I.2.2 Etudes sur le terrain	9
I.2.2.1 Influence de la formulation	
sur le comportement de B.t.i.	
en eau courante	10
I.2.2.2 Influence du débit sur la	
portée de B.t.i.	11
I.3 But du projet	13
I.3.1 Problématique	13

I.3.2	Choix de la méthode de concentration des échantillons de B.t.i.	16
I.3.3	Objectifs du projet	17
II.	MATERIEL ET METHODES	18
II.1	Expériences sur le terrain	21
II.1.1	Traçage au sel	23
II.1.2	Traçage à la rhodamine	23
II.1.3	Traçage au B.t.i.	25
II.2	Expériences au laboratoire	29
II.2.1	Analyse des échantillons de rhodamine	29
II.2.2	Analyse des échantillons de B.t.i . .	31
II.2.2.1	Préparation des échantillons. .	31
II.2.2.1.1	Fonctionnement de l'appareil.	33
II.2.2.1.2	Filtration des échan- tillons	36
II.2.2.2	Matériel utilisé pour les essais biologiques	38
II.2.2.3	Réalisation des tests bio- logiques	39
II.2.2.3.1	Détermination des four- chettes de concentration.	40
II.2.2.3.2	Comptage de la mortalité .	41
II.2.2.3.3	Tests définitifs	41
II.2.2.4	Méthode statistique d'analyse	

des tests biologiques.	42
II.2.3 Calcul de l'efficacité relative d'une suspension	45
II.2.4 Détermination du pourcentage de récupé- ration.	47
II.2.5 Détermination de la longueur de perte .	48
III. RESULTATS.	53
III.1 Tests préliminaires en laboratoire.	53
III.2 Traçage à la rhodamine	55
III.2.1 Analyse des courbes de rhodamine.	55
III.2.2 Paramètres de transport	58
III.3 Traçage au B.t.i.	62
III.3.1 Ultrafiltration	62
III.3.2 Analyse des tests biologiques	62
III.3.3 Concentration comparée des témoins et des retentats.	67
III.3.4 Analyse de la perte de B.t.i. dans les cours d'eau étudiés	70
IV. DISCUSSION.	89
IV.1 Analyse de la méthode des tests biologiques	89
IV.2 Evaluation de la méthode d'ultrafiltration	91
IV.3 Déplacement de l'activité toxique de l'in- secticide en eau courante	98
V. BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES TABLEAUX

Pages

Tableaux

1. Classification des différentes souches
de Bacillus thuringiensis selon le sérotype H. . . . 6
2. Planification des prises d'échantillons de B.t.i.
(rivière aux BETES PUANTES). 27
3. Planification des prises d'échantillons de B.t.i.
(ruisseau du petit lac FRASER). 28
4. Résultats des tests préliminaires effectués en
laboratoire 54
5. Paramètres de transport (rivière aux BETES PUANTES) 59
6. Paramètres de transport (ruisseau du petit lac
FRASER) 60
7. Résultats de l'ultrafiltration (rivière aux
BETES PUANTES). 63
8. Résultats de l'ultrafiltration (ruisseau du petit
lac FRASER) 64
9. Résultats de l'analyse probit des tests biologiques
(rivière aux BETES PUANTES) 65

10.	Résultats de l'analyse probit des tests biologiques (ruisseau du petit lac FRASER).	66
11.	Calcul des concentrations après analyse probit (rivière aux BETES PUANTES)	68
12.	Calcul des concentrations après analyse probit (ruisseau du petit lac FRASER).	69
13.	Perte de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES)	71
14.	Perte de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER). . .	72
15.	Détermination de la dose de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES).	82
16.	Détermination de la dose de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER)	83
17.	Détermination de la longueur de perte (rivière aux BETES PUANTES).	87
18.	Détermination de la longueur de perte (ruisseau du petit lac FRASER)	88
19.	Comparaison des résultats de nos tests biologiques avec les données d'Ibarra et Federici	92

LISTE DES FIGURES

Pages

Figures

1.	Représentation schématique du déplacement longitudinal d'un insecticide dans un cours d'eau . . .	20
2.	Diagramme des procédures (terrain)	22
3.	Diagramme des procédures (laboratoire)	30
4.	Appareil d'ultrafiltration PELLICON de Millipore.	34
5.	Schéma de fonctionnement de l'appareil d'ultrafiltration	35
6.	Détermination du coefficient d'activité relative .	46
7.	Courbe de la concentration de rhodamine en fonction du temps de prélèvement de l'échantillon (rivière aux BETES PUANTES).	56
8.	Courbe de la concentration de rhodamine en fonction du temps de prélèvement de l'échantillon (ruisseau du petit lac FRASER)	57
9A.	Représentation graphique des concentrations	

	attendue et observée de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES: témoin de la station 1)	73
9B.	Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i.(rivière aux BETES PUANTES: retentat de la station 1)	73
10A.	Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES: témoin de la station 2)	74
10B.	Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES: retentat de la station 2)	74
11A.	Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES: témoin de la station 3)	75
11B.	Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES: retentat de la station 3)	75
12.	Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (rivière aux BETES PUANTES: retentat de la station 4)	76

13A. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: témoin de la station 1).	77
13B. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: rettentat de la station 1)	77
14A. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: témoin de la station 2).	78
14B. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: retentat de la station 2).	78
15A. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: témoin de la station 3).	79
15B. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: retentat de la station 3).	79
16A. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit	

lac FRASER: témoin de la station 4).	80
16B. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: retentat de la station 4).	80
17A. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: témoin de la station 5).	81
17B. Représentation graphique des concentrations attendue et observée de B.t.i. (ruisseau du petit lac FRASER: retentat de la station 5).	81
18. Représentation graphique de la dose de B.t.i. en fonction de la distance (rivière aux BETES PUANTES)	84
19. Représentation graphique de la dose de B.t.i. en fonction de la distance (ruisseau du petit lac FRASER).	85

LISTE DES ABREVIATIONS

g.L^{-1}	=	gramme par litre
mg.L^{-1}	=	milligramme par litre
mg.s.L^{-1}	=	milligramme seconde par litre
m	=	mètre
m.s^{-1}	=	mètre par seconde
$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$	=	mètre cube par seconde
km	=	kilomètre
mL	=	millilitre
min	=	minute
μm	=	micromètre
$\mu\text{g.L}^{-1}$	=	microgramme par litre

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I.1 Connaissances actuelles sur le *Bacillus thuringiensis*

Le *Bacillus thuringiensis* (B.t.) fait partie d'un groupe de bacilles, Gram-positifs, mobiles, à spore ovale subterminale, non déformante. Ils sont aérobies facultatifs sur gélose gélatine sans nitrates, et sont du type fermentatif sans gaz sur milieu de Hugh et Leifson glucosé (de Barjac et Bonnefoi, 1967). Taxonomiquement très proche de *Bacillus cereus* (Carleton et Gonzalez, 1985), le B.t. possède cependant une particularité: la capacité de produire une inclusion protéique dite "cristal", pathogène pour les larves de certains insectes. La présence d'une endotoxine protéique (delta endotoxine) dans le cristal est responsable de la toxicité du B.t. pour les larves de Diptères et de Lépidoptères. Ce pouvoir larvicide fait de B.t. un des agents insecticides les plus employés dans la lutte biologique. Cependant, le B.t. peut produire d'autres toxines telles l'alpha exotoxine, la bêta exotoxine et des exoenzymes. L'alpha exotoxine et les exoenzymes ont une activité

biologique non recherchée. La bêta exotoxine thermostable, moins spécifique que la delta endotoxine peut-être toxique pour les mammifères. Pour ces raisons, seules les variétés de B.t. ne produisant pas ces substances (exotoxines, exoenzymes) sont utilisées dans les préparations commerciales.

Les premières études sur la pathogénicité de Bacillus thuringiensis remontent au début du 20^{ème} siècle, plus précisément en 1905, quand Ishiwata isola chez des larves de vers à soie malades (Bombyx mori), une bactérie qu'il nomma Bacillus sotto. De nos jours, cette bactérie est désignée sous le nom de Bacillus thuringiensis sérovariété sotto (sérotypage H4a,4b). En ce qui se rapporte à la dénomination Bacillus thuringiensis, elle nous vient de Berliner. Ce dernier travaillait en Allemagne (1902 - 1916) sur une maladie infectieuse de la Pyrale méditerranéenne de la farine (Anagasta kuehniella), retrouvée originalement dans les moulins de Thuringen. La découverte d'une bactérie comme étant l'agent responsable de l'infection, l'incita à la dénommer Bacillus thuringiensis (Berliner, 1915) en souvenir de la ville de Thuringen. Cette bactérie est désignée de nos jours sous le nom de Bacillus thuringiensis sérovariété Berliner ou thuringiensis (sérotypage H1).

Bien que B. thuringiensis ait été isolé en 1915, il fallut attendre les années 50 pour assister à l'exploitation

du pouvoir pathogène de ce microorganisme. Cette nouvelle orientation était due à la résistance croissante des insectes aux pesticides chimiques, et aux dommages causés à l'environnement par ces derniers. Il est important de mentionner que dans cette recherche d'insecticides biologiques, peu de microorganismes ont été retenus. Plusieurs virus ont été sélectionnés pour le contrôle des insectes nuisibles en agriculture et en foresterie, mais aucun n'a été utilisé à grande échelle (Lüthy et al., 1982). En effet, les virus étant des parasites intracellulaires obligatoires, la production in vitro de cultures cellulaires est assez faible, pour prétendre les produire en grande quantité. Seules les bactéries permettaient une production de masse sans contrainte majeure.

A la fin des années 50, de nombreuses bactéries produisant un cristal parasporal, et particulièrement pathogènes pour les Lépidoptères, avaient été isolées de plusieurs insectes (Delaporte et Beguin, 1955; Talalaev, 1956; Isakova, 1958; Heimpel et Angus, 1958). Mais ces bactéries différaient par certains de leurs caractères et par leur pouvoir pathogène sur les insectes, d'où la nécessité de bien les connaître et les identifier. Divers essais de classifications biologiques réalisés sur plusieurs souches de B. thuringiensis par différents auteurs (Heimpel et Angus, 1959; Toumanoff et le Coroller, 1959; Krieg, 1961), ont

conduit d'une part à mettre en évidence un grand nombre de caractères communs, et d'autre part, à relever des caractères différentiels qui en permettent l'individualisation. Parallèlement, l'étude sérologique par la technique de l'agglutination flagellaire (Bonnefoi et de Barjac 1963) a permis de distinguer les différents sérotypes. A chaque sérotype, correspond un groupe biochimique basé sur un antigène H (antigène flagellaire) qui est un groupe spécifique. Deux sérotypes peuvent être divisés en deux biotypes, s'ils ont le même antigène H, mais différent biochimiquement.

Jusqu'en 1977, les 13 sérotypes connus de Bacillus thuringiensis (tableau 1), caractérisés par les antigènes H1 à H13 (de Barjac et Bonnefoi, 1973; de Barjac et al., 1977) n'étaient essentiellement pathogènes que pour les Lépidoptères. Ceci limitait leur utilisation à l'agriculture ou à la foresterie. La découverte d'un 14^{ème} sérotype, individualisé sous le nom de sérovariété israelensis (de Barjac 1978a,b), isolé par Golberg et Margalit (1977), vint élargir considérablement le potentiel d'application de B. thuringiensis. La quasi absence de toxicité de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis (B.t.i.) sur les larves de Lépidoptères introduisit la notion de spécificité dans son pouvoir pathogène pour les larves aquatiques de mouches noires et de moustiques, en le distinguant formellement des

autres sérotypes de B.t., pathogènes pour les Lépidoptères (de Barjac, 1978). Depuis, plusieurs nouveaux sérotypes H furent isolés, portant ainsi le nombre à 23 (tableau 1).

Avant la découverte de B.t.i., la seule espèce bactérienne retenue pour son pouvoir pathogène vis-à-vis des larves de moustiques était Bacillus sphaericus (Singer, 1973; Davidson et al., 1975). Cependant, des études réalisées par de Barjac en 1978 (a,b) sur la toxicité relative du B.t.i. pour les larves d'Aedes aegypti et Anopheles stephensi ont permis de montrer une activité 100 fois supérieure à celle de Bacillus sphaericus.

Suite à la découverte du B.t.i., de nombreuses études furent entreprises par les chercheurs. Les études effectuées au début, visaient surtout à démontrer son efficacité en laboratoire contre les culicides (Golberg et Margalit, 1977) et les simulies (Undeen et al., 1978; Undeen et Berl, 1979). La grande activité toxique démontrée par le B.t.i. face à certaines larves de Diptères (moustiques et mouches noires), permit de l'utiliser comme insecticide pour le contrôle de l'onchocercose en Afrique. Il s'agissait de la première utilisation de B.t.i. dans le domaine de la santé publique.

Les aspects fondamentaux du B.t.i. ont été abordés par Fast (1982), Lüthy et al. (1982), Amstrong et al. (1985),

Tableau 1

Classification des différentes souches de Bacillus
thuringiensis selon le sérotype H

Sérovariété	Sérotype H	Sérovariété	Sérotype H
<u>thuringiensis</u>	1	<u>darmstadiensis</u>	10
<u>finitimus</u>	2	<u>toumanoffi</u>	11a,11b
<u>alesti</u>	3a	<u>kyushuensis</u>	11a,11c
<u>kurstaki</u>	3a,3b	<u>thompsoni</u>	12
<u>sotto</u>	4a,4b	<u>pakistani</u>	13
<u>dendrolimus</u>	4a,4b	<u>israelensis</u>	14
<u>kenyae</u>	4a,4c	<u>dakota</u>	15
<u>galleriae</u>	5a,5b	<u>indiana</u>	16
<u>canadensis</u>	5a,5c	<u>tohokuensis</u>	17
<u>subtoxicus</u>	6	<u>kumamotoensis</u>	18
<u>entomocidus</u>	6	<u>tochigiensis</u>	19
<u>aizawai</u>	7	<u>yunnanensis</u>	20a,20b
<u>morrisoni</u>	8a,8b	<u>pondicheriensis</u>	20a,20c
<u>ostrinae</u>	8a,8c	<u>colmeri</u>	21
<u>nigeriensis</u>	8b,8c	<u>shandongiensis</u>	22
<u>tolworthi</u>	9	<u>japonensis</u>	23

Cheung et Hammock (1985), Insell et Fritz-James (1985). Ces chercheurs ont montré que la plupart des variétés possèdent un cristal bipyramidal formé d'un dimère de polypeptides. Chaque sous-unité du dimère a un poids moléculaire de 130 000 daltons. A l'opposé, le B.t.i. présente des cristaux polymorphes, formés généralement de trois protéines majeures (230 000, 130 000 et 28 000 daltons). Mais seules les fractions (230 000 et de 130 000) possèdent une activité larvicide. L'autre fraction (28 000) ne possède qu'une activité hémolytique (Visser et al., 1986).

Malgré la différence entre les cristaux (taille, forme et composition), le mode d'action semble être le même pour toutes les variétés de Bacillus thuringiensis (de Barjac, 1978c). Après ingestion du cristal par l'insecte, l'effet primaire observé est la dégénérescence des cellules épithéliales de l'intestin moyen (Angus, 1970; Fast, 1974). D'après Lecadet (1965), cet effet serait produit par une toxine libérée à partir des cristaux, grâce à une hydrolyse enzymatique en milieu alcalin. Or l'intestin moyen des larves de Diptères aquatiques est caractérisé par un pH alcalin (pH 10 à 11) et par une richesse en enzymes protéolytiques (Dadd, 1975). Ce milieu intestinal réunit toutes les conditions requises pour l'expression de la toxine. La désintégration de l'épithélium intestinal, par distorsion puis éclatement des

cellules, serait due à l'interaction de la toxine avec les lipides membranaires (de Barjac, 1978b).

Du fait de l'avenir prometteur du B.t.i., des études sur les facteurs pouvant affecter son efficacité furent entreprises afin d'optimiser son application.

1.2 Etudes des facteurs conditionnant l'efficacité de B.t.i contre les simuliés.

1.2.1 Etudes au laboratoire

Des études (Frommer et al., 1980; Molloy et al., 1981; Lacoursière, 1985) ont porté sur l'effet de certains facteurs (température, concentration de l'insecticide, temps de contact et âge des larves) pouvant affecter l'activité larvicide de B.t.i.. Ces recherches ont démontré que pour une même concentration d'insecticide, la mortalité des larves de Simulium augmentait avec la température, et avec le temps de contact. Molloy et al. (1981) ont en outre précisé que les larves jeunes sont plus sensibles que les larves âgées. Des conclusions du même genre avaient été formulées par Guillet et Escaffre (1979).

D'autres travaux de laboratoire (Guillet et al., 1985) ont permis de mettre en évidence l'importance de la taille des particules pour l'efficacité du B.t.i.. Ainsi, il a été

démontré que la taille moyenne optimum conférant la meilleure efficacité sur les larves de simulies se situe entre 30 et 50 μm .

Les tests en laboratoire démontrent le très grand potentiel du B.t.i. comme agent de contrôle biologique.

1.2.2 Etudes sur le terrain

A côté des travaux de laboratoire, des expériences de terrain ont été entreprises, afin de vérifier l'efficacité du B.t.i. en milieu aquatique naturel.

Les premiers travaux sur l'utilisation du B.t.i. en milieu aquatique naturel pour le contrôle des mouches noires (Simulium damnosum s.l.), ont été rapportés par Guillet et de Barjac (1979). Les résultats obtenus suite aux essais réalisés avec une poudre primaire non formulée (R153-78 Biochem products) sur les larves de simulies furent si encourageants, que trois formulations expérimentales ont été immédiatement produites par l'industrie. Il fut alors démontré que l'efficacité de ces trois formulations dépendait de la taille des particules (agrégats de spores et cristaux d'endotoxine) en suspension (Guillet et Escaffre, 1979; Molloy et al., 1981). Il s'agissait donc de déterminer les formulations qui seraient les mieux adaptées aux applications

opérationnelles, et étudier les facteurs qui conditionnent leur efficacité en milieu aquatique naturel.

Il est à noter que les travaux de recherches en laboratoire et sur le terrain ont permis de mettre en évidence un avantage important du B.t.i. dans les conditions opérationnelles. En effet et contrairement aux insecticides chimiques, le B.t.i. est efficace à des températures de l'ordre de 1°C (à la condition d'augmenter la dose), ce qui dans le contexte nord-américain en fait l'insecticide de choix pour les traitements printaniers.

1.2.2.1 Influence de la formulation sur le le comportement de B.t.i. en eau courante

Molloy et Jamnback (1981b) ont étudié le comportement du Bactimos^R WP (grosses particules i.e. agrégats d'une taille moyenne supérieure à 20 µm) et du Teknar^R WDC (fines particules i.e. spores et cristaux d'endotoxine séparés dont les tailles sont de l'ordre de 0.5 à 5 µm) dans un ruisseau de l'état de New-York. Les expériences ont montré que les grosses particules du Bactimos^R WP étaient beaucoup plus efficaces que les fines particules du Teknar^R WDC. Mais cette efficacité des formulations à grosses particules peut diminuer si la turbidité de l'eau dans laquelle elles sont employées augmente, ou si le temps de contact est court (Guillet et al, 1985b). Au contraire, les formulations à

fines particules (Teknar^R) sont peu affectées par ces conditions et constituent un type de formulation mieux adapté pour un usage opérationnel, même en condition d'eau turbide (Guillet et al., 1985b). De plus, les grosses particules sédimentent beaucoup plus rapidement que les fines particules, entraînant une diminution probable de leur "portée efficace" : distance sur laquelle le produit reste efficace à 100% en aval du point d'épandage. Des observations comparables ont été faites par Lacey et al. (1984).

Des études réalisées par Lacey et Heitzman (1985) ont montré que le comportement de B.t.i. en milieu naturel pouvait être affecté par la viscosité et la capacité des formulations à former des mélanges homogènes avec l'eau. En effet, les formulations moins visqueuses et miscibles à l'eau se dispersent mieux et ont une portée plus grande. De ce fait, le Teknar^R (concentré aqueux) présente les caractéristiques physiques optimales pour une application opérationnelle en eau courante.

1.2.2.2 Influence du débit sur la portée de B.t.i.

D'autres essais de terrain ont permis à Undeen et Colbo (1980), de mettre en évidence la corrélation existant entre la portée et le débit du cours d'eau. Les expériences

réalisées sur quatre ruisseaux (débit de 3,5 à 57 L.s⁻¹; température 3 à 22°C) avec des suspensions aqueuses non commerciales de B.t.i. (produites sur gélose de tryptose au sang) démontrent que la portée du B.t.i. augmente avec le débit. Des observations identiques ont été faites par Undeen et al. (1981) lors d'expériences sur de petits ruisseaux du Guatemala et par Lacey et al. (1982) sur une rivière de l'Afrique de l'Ouest (débit de 45×10^4 L.s⁻¹) avec du Teknar^R WDC. Ce qui permet de dire que le débit peut-être un estimateur de la portée de l'insecticide.

On retrouve également des travaux sur les effets possibles du B.t.i. sur la faune et la flore aquatique, ainsi que sur les animaux et les hommes (Dejoux, 1979; Colbo et Undeen, 1980; Shadduck, 1980; Miura, 1982; Back et al., 1985). Ces auteurs ont démontré que le B.t.i. est toxique pour une gamme restreinte de Diptères (mouches noires, moustiques, Chironomidae et Blephariceridae) et n'est pas susceptible de s'accumuler dans la chaîne alimentaire à cause de son caractère protéique qui facilite sa dégradation. Du fait de sa spécificité, il est sécuritaire pour la faune non-cible et les hommes. Jusqu'à ce jour, aucun cas de résistance croisée avec un insecticide chimique n'a été signalée.

1.3 But du projet

1.3.1 Problématique

La résistance croissante des insectes piqueurs aux insecticides chimiques a provoqué l'utilisation à grande échelle de B.t.i. en Afrique de l'Ouest, en Europe et en Amérique du Nord pour le contrôle des larves aquatiques de Diptères. Cependant, de nombreux problèmes se posent si l'on veut étudier le transport de cet insecticide en eau courante. En effet, la taille variable des particules occasionne une prédiction limitée de la portée en eau courante. De plus, pour mesurer la portée, il faut pouvoir doser la quantité de matière active (cristaux) qui parvient à différentes distances en aval d'un point d'épandage.

Les techniques antérieures comme le compte des spores utilisé par certains auteurs pour évaluer l'efficacité d'une préparation ne renseignent pas sur la valeur toxique car l'ingrédient actif se trouve dans le cristal et non dans la spore. Les méthodes sérologiques, telles l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assays) développée pour le Bacillus thuringiensis (Smith et Ulrch, 1983; Temeyer et al., 1986), permettent d'étudier les protéines du cristal ou de déterminer la concentration antigénique de la toxine; mais ceci ne permet pas nécessairement la mesure de la

concentration d'un échantillon en valeur toxique pour l'espèce cible.

La seule méthode couramment utilisée pour quantifier la toxicité d'une préparation est la méthode des essais biologiques sur les larves de mouches noires ou de moustiques. Mais la sensibilité des différents stades larvaires est variable au cours des essais biologiques. L'idée d'une standardisation fut alors proposée par de Barjac et Larget (1979), puis suivie par Rishikesh et Quelennec (1983) et Mc Laughlin et al. (1984). Mais la standardisation reste un problème majeur, car le spectre d'activité de la toxine varie selon l'espèce de larve, et les résultats sont fonctions de la technique utilisée. Malgré toutes ces difficultés, les essais biologiques demeurent la meilleure voie de détermination de l'activité relative d'une préparation. Cette méthode de dosage par essais biologiques directs sur les échantillons de terrain fournit un estimé de leur concentration après comparaison avec un standard. Mais un problème de dosage peut se poser lorsque la concentration de l'ingrédient actif est en dessous d'un certain seuil de détection. Ces concentrations dites sublétales pour les larves de moustiques ou de mouches noires sont impossibles à déterminer par des tests biologiques.

Il convient donc d'utiliser une technique permettant d'obtenir, à partir d'échantillons à concentration sublétale,

des échantillons plus concentrés sur lesquels on peut doser l'ingrédient par des essais biologiques. Plusieurs méthodes existent, mais parmi les plus connues, on peut citer la centrifugation, la filtration, l'ultrafiltration classique et l'ultrafiltration tangentielle.

La centrifugation est efficace et permet de séparer les éléments contenus dans un volume de plusieurs litres. Mais ce système ne concentre que du matériel particulaire et parfois une perte de l'ordre de 25% peut être enregistrée lors de l'opération. De plus, il est encombrant et coûteux. La filtration sur filtre et l'ultrafiltration classique sont des systèmes faciles d'utilisation et peu coûteux. Cependant un blocage peut se produire au niveau des filtres si la concentration des matières en suspension est élevée. L'ultrafiltration classique est un système lent, tandis que la filtration sur filtre est rapide, mais possède un faible pouvoir de récupération. L'ultrafiltration tangentielle est un système versatile de séparation qui permet de concentrer les particules et les protéines avec peu de risques de les altérer. La filtration se fait par écoulement tangentiel rapide sous pression, empêchant le colmatage des filtres. En plus du pourcentage de récupération élevé (de l'ordre de 90%), ce système est simple, relativement peu coûteux, rapide et facile à entretenir.

1.3.2 Choix de la méthode de concentration des échantillons

Dans notre étude il s'agit de trouver de quelle façon on peut à partir d'échantillons à concentration sublétales, obtenir des échantillons plus concentrés, et donc analysables par des tests biologiques. Diverses contraintes doivent être prises en considération dans le choix d'une méthode:

- volume d'eau traité par échantillon (20 L) en un temps raisonnable, car les tests biologiques exigent des volumes de solution à tester de l'ordre du litre en raison des dilutions sérielles et du nombre de répliques utilisées,
- maintien de l'intégrité des cristaux du B.t.i.,
- taux optimum de concentration des cristaux,
- pourcentage de récupération des cristaux élevé et fiable,
- enfin, cette méthode doit être simple d'application et peu coûteuse par échantillon.

Compte tenu de ces exigences, les inconvénients de ces trois méthodes (centrifugation, filtration, ultrafiltration classique) nous ont amené à choisir le système d'ultrafiltration tangentielle Pellicon produit par Millipore comme méthode de concentration.

1.3.3 Objectifs du projet

Le présent sujet vise deux objectifs principaux:

- le premier objectif est la mise au point en laboratoire d'une méthodologie simple et fiable qui permet de concentrer l'ingrédient actif contenu dans les échantillons à concentration sublétales de B.t.i. afin de les doser très précisément,

- le deuxième objectif est l'application de cette méthode aux échantillons de terrain afin d'élaborer un modèle de prédiction des concentrations de l'insecticide en rivière. Ce modèle permettra d'analyser et de planifier l'application de B.t.i. en rivière avec un maximum d'efficacité pour un minimum de coût d'épandage et d'insecticide.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

Dans le but de mettre au point la méthodologie à utiliser pour concentrer les particules de B.t.i. contenues dans les échantillons, nous avons effectué des expériences préliminaires en laboratoire. Elles consistaient à préparer des suspensions de différentes concentrations de Teknar^R WDC ou HPD (Zoecon Ltd. U.S.A.), que nous soumettions à l'ultrafiltration. Avant l'ultrafiltration, nous prélevions un volume de l'ordre du litre qui servira de témoin de l'échantillon à filtrer. Le retentat ou concentré obtenu après ultrafiltration, ainsi que le témoin serviront à faire des tests biologiques sur des larves de moustiques. La comparaison des résultats (témoin et retentat) après analyse permet de déterminer le rendement de l'appareil. L'autre objectif de ces expériences était de vérifier l'influence de certains paramètres (pression, vitesse de circulation du liquide et nombre de filtres) sur le pourcentage de récupération.

Suite aux travaux de laboratoire, nous avons effectué des expériences de terrain en Mai 1986, dans le but d'étudier le transport de B.t.i. en eau courante et d'appliquer aux

échantillons recueillis, la technique mise au point en laboratoire. Nous avons choisi pour notre étude, la rivière aux BETES PUANTES et un ruisseau du petit lac FRASER, situés dans la réserve Saint-Maurice, approximativement à 75 Km au Nord-Ouest de Trois-Rivières.

Ces expériences ont consisté dans une première étape à effectuer un traçage à la rhodamine WT (Crompton and Knowles Inc. U.S.A.) pour déterminer les paramètres de transport (vitesse de déplacement, dispersion et perte du produit) propres aux segments de rivières étudiés. Nous avons utilisé la rhodamine car elle simule bien le déplacement de la masse d'eau et d'après la littérature, ce traceur ne s'adsorbe pas sur les matières organiques et minérales. Les paramètres (vitesse de déplacement et dispersion) sont exclusivement fonction du cours d'eau, tandis que la perte dépend du produit utilisé. Ces différents paramètres ont été étudiés en suivant l'exemple d'un épandage à concentration constante durant une période déterminée (figure 1). La dispersion correspond à l'étirement de la courbe temps-concentration en fonction de la distance parcourue, c'est à dire l'augmentation de la variance de la courbe par unité de temps. La perte correspond à la diminution de la dose (aire sous la courbe), tandis que la vitesse de déplacement est le rapport d'une distance donnée, sur le temps mis pour la parcourir.

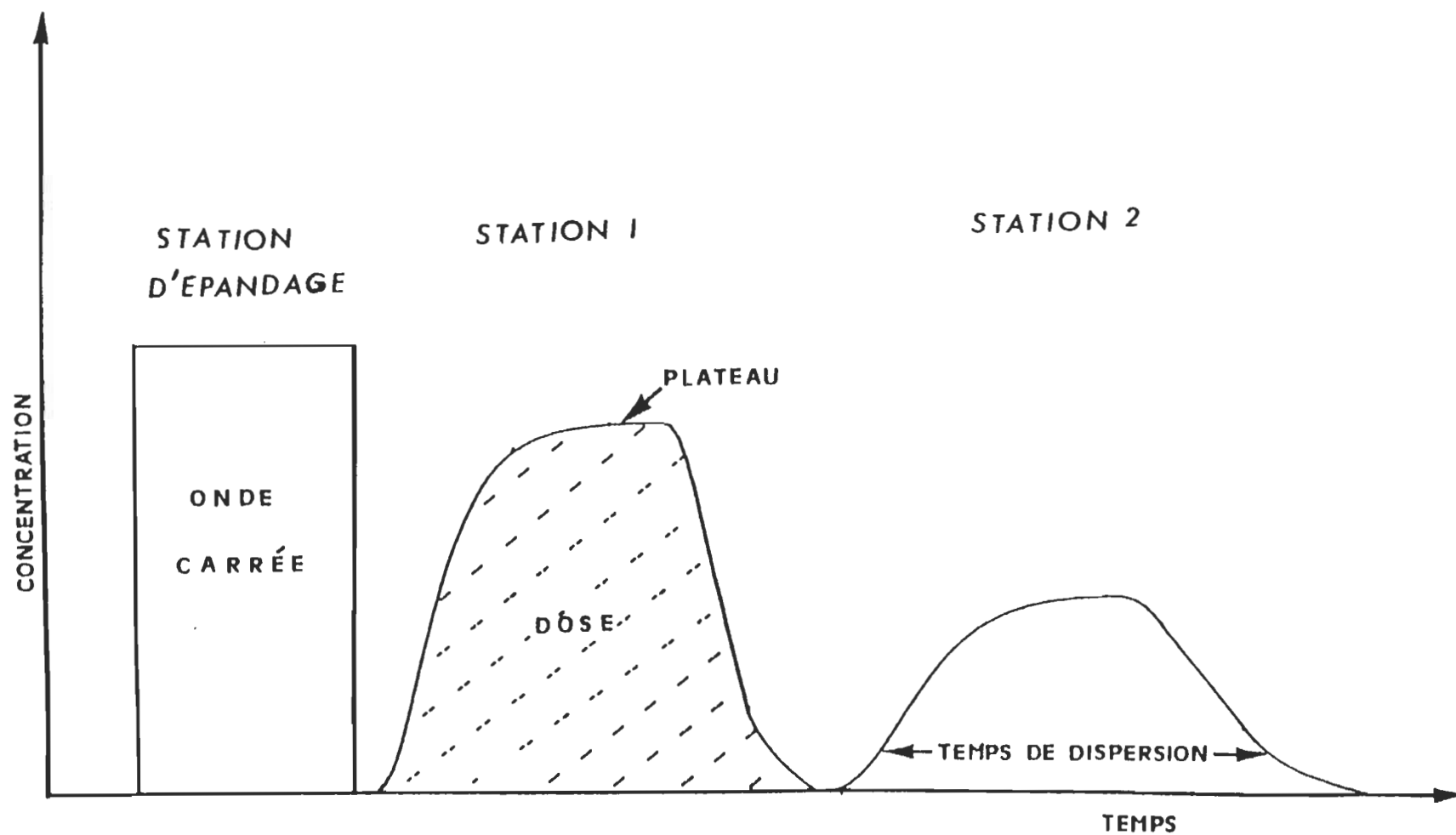


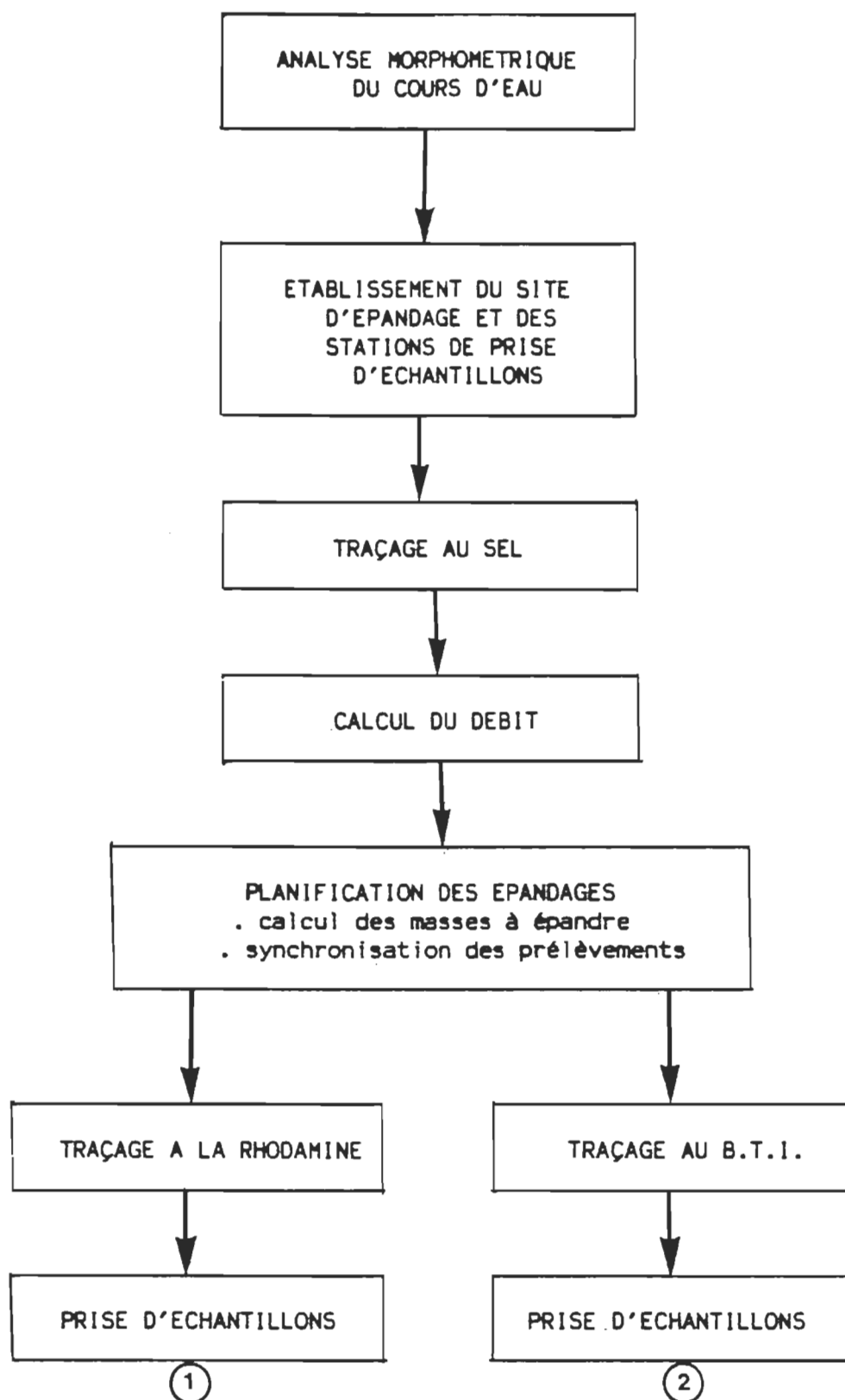
Figure 1. Représentation schématique du déplacement longitudinal d'un insecticide dans un cours d'eau.

Dans une seconde étape, un traçage au B.t.i. a été effectué dans les mêmes conditions que pour la rhodamine. Le dosage des échantillons recueillis permet de suivre le transport de l'insecticide. Nous pouvons ainsi mesurer la perte de B.t.i. par comparaison avec la rhodamine.

Afin d'effectuer les différents tracages (rhodamine et B.t.i.) le protocole de terrain suivant a été mis au point (figure 2):

II.1 Expérience sur le terrain

On effectue dans un premier temps une analyse morphométrique des cours d'eau, qui consiste à choisir des sections (1200 m pour la rivière aux BETES PUANTES et 662 m pour le ruisseau du petit lac FRASER) ne présentant aucun obstacle physique majeur (i.e. méandre, dépression en profondeur du lit de la rivière ou de constriction de la rivière). Ces distances ont été choisies en tenant compte de l'effet de la dispersion sur la variation de la concentration de B.t.i.. En effet, dans les cours d'eau à faible débit (ruisseau du petit lac FRASER: débit de 142 L.s^{-1}) la grande dispersion entraîne une baisse rapide de la concentration de B.t.i. sur de courtes distances. Il était donc important d'avoir une courte section sur le ruisseau du petit lac



Les échantillons de rhodamine ① et de B.t.i. ② sont analysés au laboratoire (voir figure 3).

Figure 2. Diagramme des procédures (terrain).

FRASER et une grande sur la rivière aux BETES PUANTES (débit de 1350 L.s^{-1}). Des stations d'échantillonnage ont ensuite été établies (rivière aux BETES PUANTES: 300 m; 520 m; 800 m et 1200 m, puis pour l'émissaire du petit lac FRASER: 131m; 228 m; 302 m; 412 m et 622 m) en aval du point d'épandage de manière à avoir des sections homogènes.

Dans un second temps, des traçages au sel, à la rhodamine et au B.t.i. ont été effectués sur ces rivières.

II.1.1 Traçage au sel

Le sel est un traceur économique dont l'utilisation permet d'optimiser celle de la rhodamine qui est plus efficace, mais coûteuse. De plus, on peut mesurer concentration du sel directement sur le terrain à l'aide d'un conductivimètre. Nous avons effectué des traçages pour calculer la vitesse moyenne du cours d'eau et le débit. La détermination du débit et la mesure de la vitesse aident planifier les épandages (concentration initiale de produit à utiliser; synchronisation des prises d'échantillons).

II.1.2 Traçage à la rhodamine

Il a été noté que dans les petits cours d'eau (faible débit), la dispersion était plus grande, ce qui nécessitait une dose plus forte. Suite à des expériences préliminaires,

nous avons pu déterminer les doses adéquates en fonction du débit des cours d'eau et de la longueur des sections étudiées.

Nous avons par conséquent appliqué 700 mL et 300 mL de la solution stock de rhodamine à 200 g.L^{-1} (lot n° 24-3-4 de Crompton and Knowles). Ce qui représente des doses de 0,52 L de rhodamine par $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ de débit pour la rivière aux BETES PUANTES et 2,11 L de rhodamine par $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ de débit pour le ruisseau du petit lac FRASER. Ces quantités de rhodamine ont été versées dans des bouteilles de Mariotte de 20 L, puis le volume a été complété avec de l'eau de ruisseau. L'épandage constant d'une durée de 31 minutes (rivière aux BETES PUANTES) et de 32 minutes (ruisseau du petit lac FRASER) a permis l'obtention de plateaux aux stations en amont. Aux stations en aval, la dispersion provoque un étalement des courbes avec un maximum presque stable.

Les prises d'échantillons de la rhodamine ont été faites en fonction de l'estimé des vitesses moyennes ($0,46 \text{ m.s}^{-1}$ pour la rivière aux BETES PUANTES et $0,2 \text{ m.s}^{-1}$ pour le ruisseau du petit lac FRASER) déterminé lors du traçage au sel.

Etant donné l'allure des courbes (figure 1), les échantillons ont été pris à intervalles réguliers de trois à cinq minutes dans les débuts et les fins de passage où les concentrations varient lentement. Par ailleurs, nous

respections un intervalle d'une minute au début et à la fin des plateaux à cause du changement rapide de la concentration. Les échantillons recueillis dans les bouteilles de 100 mL sont conservés à la température de la pièce, et la lecture a été effectuée plus tard au laboratoire.

11.1.3 Traçage au B.t.i.

Les expériences de traçages ont été réalisées avec du Teknar^R HPD offert gracieusement par la compagnie Zoecon Ltd. (Canada) et titrant approximativement 1200 U.T.I./mg (Unité de Toxicité Internationale).

Les quantités de Teknar^R à épandre ont été fixées en se basant sur des expériences réalisées l'année précédente. Les résultats de ces expériences ont montré qu'à la dose de 5 L de B.t.i. par $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ de débit, il était possible d'enregistrer une mortalité supérieure à 50% lors des tests biologiques directs sur des larves de moustiques, réalisés avec des échantillons prélevés à un kilomètre en aval du point d'épandage. De ce fait, nous avons choisi pour les quantités à épandre, des volumes de 8,48 L (6,28 L de Teknar^R par $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ de débit pour la rivière aux BETES PUANTES) et 6,36 L (44,79 L de B.t.i. par $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ de débit pour le ruisseau du petit lac FRASER). Ces volumes sont versés dans des bouteilles de

Mariotte de 20 L, puis le volume est complété avec de l'eau de ruisseau.

Les épandages (37 minutes pour le ruisseau du petit lac FRASER et 36 minutes pour la rivière aux BETES PUANTES) ont été plus longs que ceux de la rhodamine à cause de la plus grande viscosité du Teknar^R. Afin d'éviter l'utilisation d'une quantité phénoménale de larves lors des tests biologiques (si le nombre d'échantillons de B.t.i. étaient équivalents à ceux de la rhodamine), nous prélevions à chaque station, trois échantillons (deux de volume ≥ 5 L et un de volume ≥ 10 L) à des temps définis (tableaux 2 et 3) correspondant aux passages des plateaux de la rhodamine (fortes concentrations). Les trois volumes recueillis sont ensuite mélangés dans des contenants plastiques, afin d'obtenir une moyenne des fortes concentrations. Cette procédure permet d'éliminer les fluctuations possibles sur les courtes distances en aval du point d'épandage, tandis qu'à une distance éloignée (1 km), la dispersion crée un plateau de concentration de plus longue durée et un seul échantillon suffit. La suspension définitive à analyser est un volume supérieur ou égal à 20 L, qu'on veut concentrer à 1 L. Un facteur de concentration de l'ordre de 20 est important parce que les essais biologiques exigent des volumes à tester de l'ordre du litre en raison des dilutions sérielles et du nombre de répliques. De plus, en concentrant 20 fois, il

devient possible de multiplier par autant de fois la sensibilité du dosage par des tests biologiques, dans la mesure où la récupération par l'ultrafiltration est bonne.

Tous les échantillons de B.t.i. recueillis à la suite de l'épandage ont été gardés à 4°C. Ceci empêche toute activité enzymatique qui pourrait dégrader les cristaux et évite la multiplication bactérienne.

Tableau 2

Planification des prises d'échantillons de B.t.i
(rivière aux BETES PUANTES)

Distance (m)	station	temps d'échantillonnage (min)	volume recueilli (L)
300	1	10	5
		12	10
		14	5
520	2	31	5
		33	10
		35	5
800	3	39	5
		41	10
		43	5
1200	4	58	5
		60	10
		62	5

Tableau 3

Planification des prises d'échantillons de B.t.i
(ruisseau du petit lac FRASER)

Distance (m)	station	temps d'échantillonnage (min)	volume recueilli (L)
131	1	22	5
		24	10
		26	5
228	2	30	5
		32	10
		34	5
302	3	34	5
		36	10
		38	5
412	4	46	5
		48	10
		50	5
622	5	58	5
		60	10
		62	5

II.2 Expériences au laboratoire

Les différents échantillons (rhodamine et B.t.i.) sont analysés au laboratoire de la manière suivante (figure 3):

II.2.1 Analyse des échantillons de rhodamine

La lecture des échantillons de rhodamine se fait à l'aide du fluorimètre Turner modèle 110, et les résultats sont exprimés en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Le calcul de ces résultats nécessite les étapes suivantes:

1- mesure du pourcentage de fluorescence de chaque échantillon de rhodamine prélevé à la suite du traçage

2- conversion du pourcentage de fluorescence en concentration de rhodamine à partir d'un étalonnage.

Dans une première étape, les solutions pour l'étalonnage ont été préparées à partir de la solution stock de rhodamine (200 g.L^{-1}) diluée avec de l'eau de ruisseau.

Pour étalonner, on soumet au fluorimètre chaque dilution et on relève le pourcentage de fluorescence pour chaque échelle de sensibilité (1X, 3X, 10X, 30X). Avant chaque mesure, on effectue une mise à zéro avec de l'eau de ruisseau pour compenser l'effet possible d'une fluorescence naturelle.

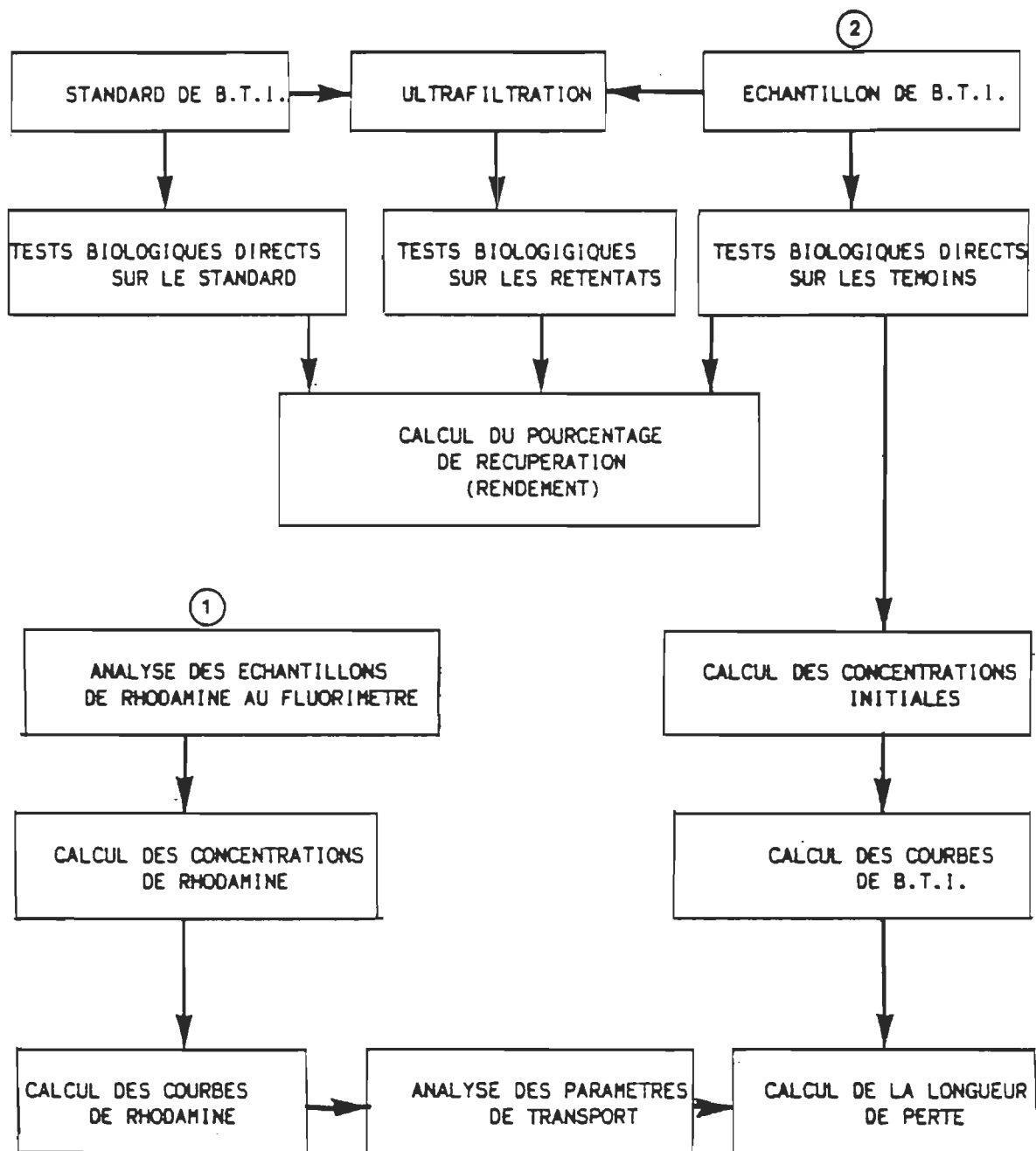


Figure 3. Diagramme des procédures (laboratoire).

On trace les courbes concentration de rhodamine-pourcentage de fluorescence pour chaque échelle de sensibilité. Puis, on calcule les droites de régression afin de déterminer les coefficients a (ordonnée à l'origine) et b (pente de la droite de régression).

Pour la deuxième étape du calcul des résultats, c'est à dire la conversion du pourcentage de fluorescence en concentration de rhodamine, on utilise les différentes valeurs de a et b pour chaque échelle de sensibilité et on détermine la concentration.

L'exemple suivant illustre le mode de calcul utilisé:

lors de l'étalonnage, on a déterminé $a = 0$ et $b = 1,765$ sur une échelle de sensibilité donnée;
un échantillon de terrain a donné un pourcentage de fluorescence de 27,4. La concentration de cet échantillon est égale à $1,765 \times 27,4 = 48,36 \mu\text{g.L}^{-1}$.

II.2.2 Analyse des échantillons de B.t.i.

II.2.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de B.t.i., prélevés aux différentes stations ont été soumis à des essais biologiques directs et à une ultrafiltration (figure 3). Parallèlement, on préparait un standard de B.t.i. (5 mg.L^{-1}) de 20 L avec de l'eau de

ruisseau, qu'on soumettait aux mêmes conditions que les échantillons. La comparaison des résultats des tests biologiques directs du standard avec ceux du retentat ou concentré du standard (après l'ultrafiltration) permet de déterminer le rendement ou pourcentage de récupération de l'appareil. Cette valeur (rendement ou pourcentage de récupération) obtenu avec les différents échantillons, permettra de juger de la fiabilité du système d'ultrafiltration PELLICON.

Avant l'ultrafiltration, un volume (de l'ordre du litre), prélevé de l'échantillon original, est conservé comme témoin. Ce témoin considéré comme une suspension contenant 100% du matériel est utilisé pour des essais biologiques directs sur des larves de moustiques (Aedes triseriatus). La comparaison des régressions probit des échantillons par rapport au standard fournit alors une valeur de la concentration originale de l'échantillon, permettant le calcul des courbes de B.t.i.. A partir de l'analyse des courbes, il est possible de déterminer la longueur de perte de l'insecticide, qui est l'un des paramètres essentiel dans un modèle de prédiction des doses.

Le volume restant de l'échantillon est mesuré précisément et est soumis à l'ultrafiltration à l'aide de

l'appareil PELLICON de Millipore (figure 4). Le concentré ou retentat obtenu, servira à faire des tests biologiques dont les résultats, comparés avec ceux du témoin permettront de déterminer le pourcentage de récupération du concentré. De plus, pour les échantillons à concentration sublétales, le concentré nous donne une valeur sûre de la concentration originale de l'échantillon.

II.2.2.1.1 Fonctionnement de l'appareil

La description de l'appareil et de son fonctionnement (figure 5) permettent de suivre les différentes étapes de l'ultrafiltration tangentielle.

L'appareil est constitué d'une cellule de filtration (1) formée de deux plaques acryliques entre lesquelles sont placées des filtres Durapore (difluoro-polyvinylidène) de 0.45 μm de diamètre de pore (2). Ces filtres ont très peu d'affinité pour les protéines, et sont très résistants aux variations de température et aux produits chimiques. De plus, on a choisi une telle porosité pour éviter la perte des petits cristaux pendant l'ultrafiltration. Les filtres sont séparés par une série de séparateurs (3). L'utilisation d'une pompe péristaltique (4) possédant une entrée de tubulures permet d'aspirer le liquide, pour l'acheminer vers la cellule de filtration. Une fraction du liquide est filtrée

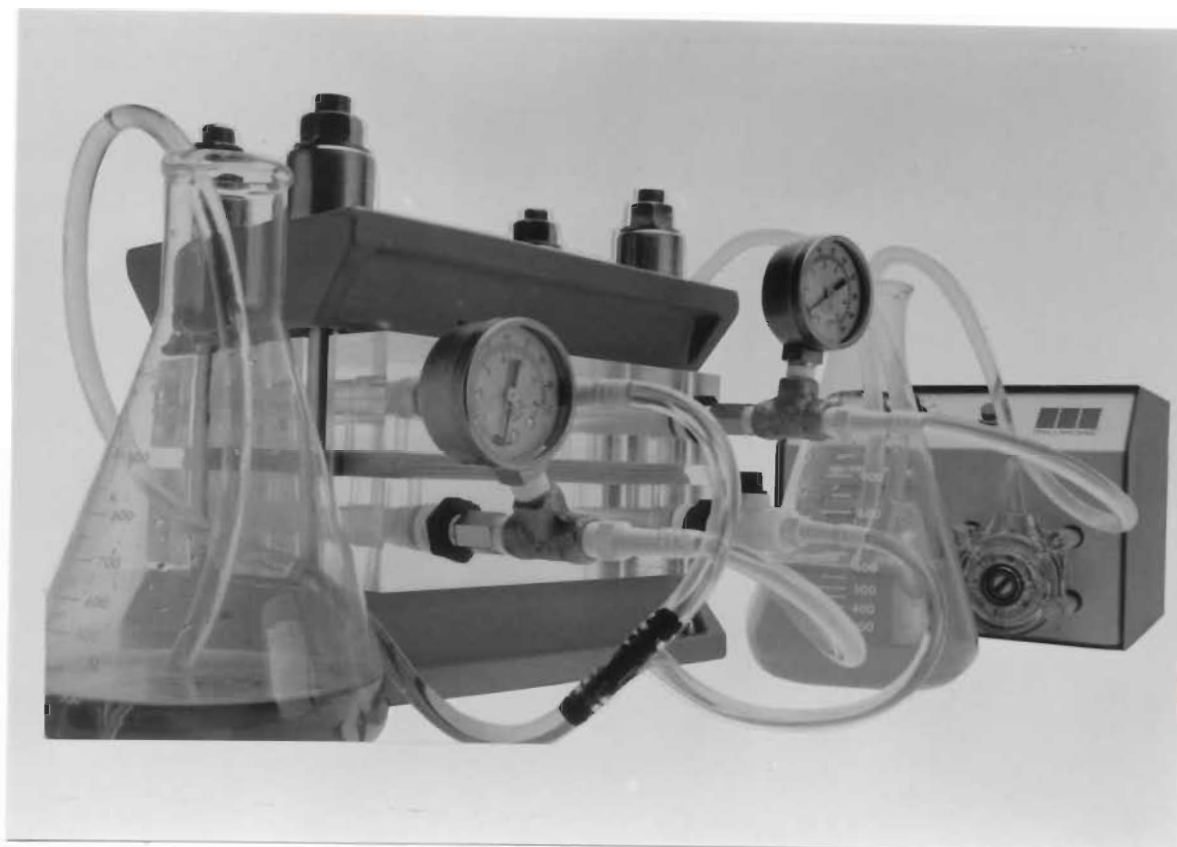


Figure 4. Appareil d'ultrafiltration PELLICON de Millipore.

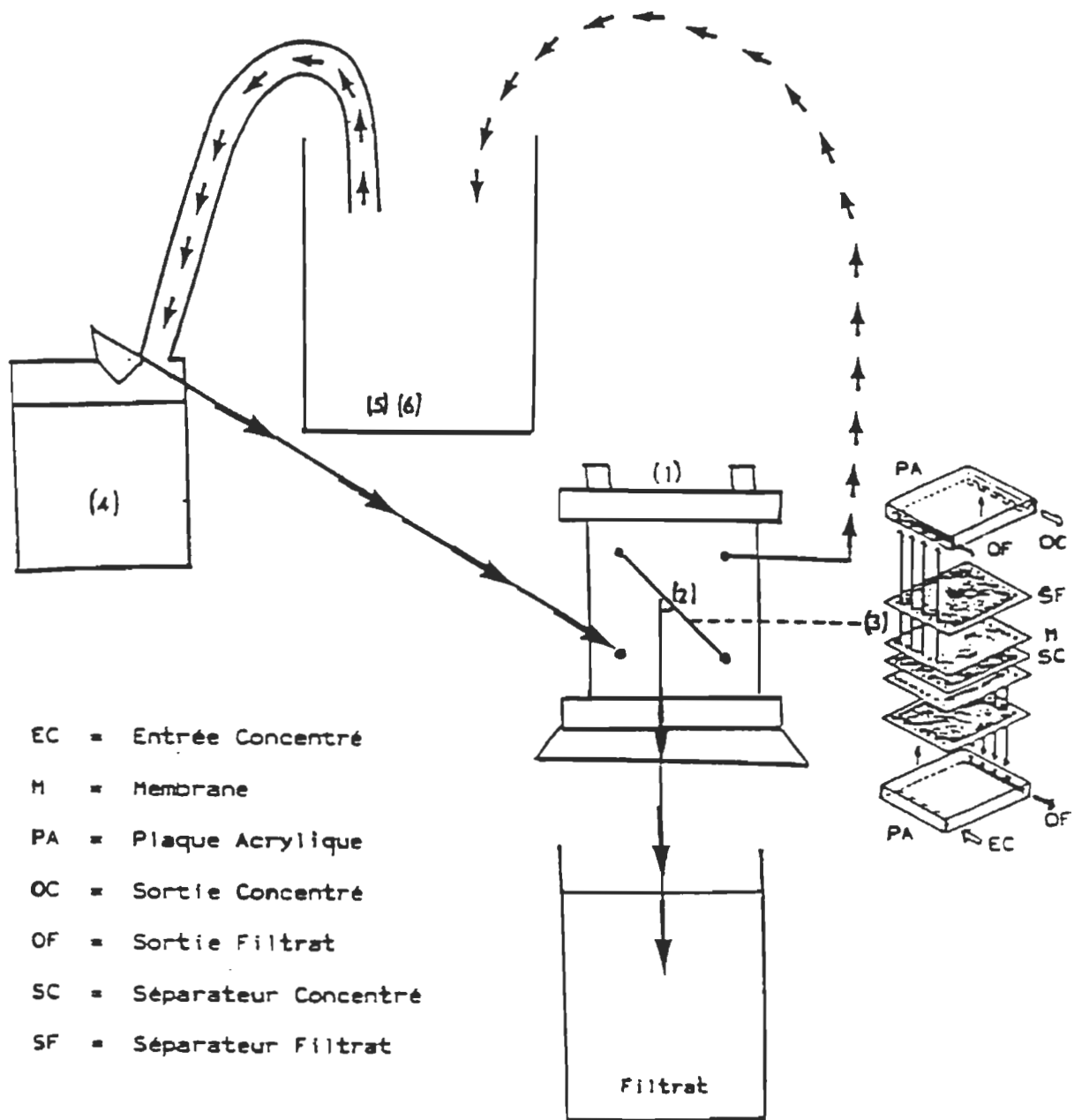


Figure 5. Schéma du fonctionnement de l'appareil d'ultra-filtration.

à la surface des membranes, alors que la partie non filtrée, retournant dans l'échantillon à filtré est appelée retentat (5). Le retentat de l'échantillon contient tout le matériel (diamètre supérieur à celui des pores) qui n'a pu être filtré. Le liquide est ensuite recyclé à travers le système et la filtration continue, réduisant ainsi le volume de la solution à filtrer (6) jusqu'au volume désiré. Le liquide circulant avec une faible pression, crée un mouvement tangentiel, qui élimine tout phénomène de polarisation et empêche le colmatage des filtres. Deux valves permettent de contrôler le débit au niveau de la membrane, tandis que la pression d'entrée est mesurée continuellement par un manomètre.

II.2.2.1.2 Filtration des échantillons

On fait circuler la suspension de B.t.i. pendant cinq minutes pour charger l'appareil (les valves filtrats étant fermées). Les valves filtrats sont ensuite ouvertes partiellement (ouverture d'un quart), puis on augmente légèrement le débit de la pompe pour rétablir la pression dans le système. Finalement, on mesure le débit du concentré de l'échantillon et le débit du filtrat. Le rapport devra être idéalement $\geq 3/1$, sinon on réajuste le débit de la pompe. Cette mesure est répétée plusieurs fois au cours de la filtration.

Après filtration de la moitié du volume de l'échantillon, on ferme les valves filtrats, on fait circuler le concentré pendant quelques minutes, puis on arrête l'appareil. La circulation tangentielle empêche l'accumulation de particules sur les filtres.

Une dizaine de minutes plus tard, l'appareil est de nouveau remis en marche, et les débits (concentré et filtrat) sont mesurés. Lorsque le concentré de l'échantillon atteint le volume souhaité (environ 1 L), on ferme les valves filtrat et on laisse circuler le liquide pendant deux ou trois minutes. Ensuite on vide les tubulures au maximum, on récupère les filtres pour les laver soigneusement dans le retentat recueilli, afin de récupérer les cristaux de B.t.i. qui seraient restés collés sur les filtres au cours de l'ultrafiltration. Finalement, on mesure précisément le volume du concentré et du filtrat pour vérifier la constance du volume mort non récupéré. Le témoin, le concentré de l'échantillon et une partie du filtrat sont conservés à 4°C dans des contenants plastiques pour les essais biologiques. Les tests réalisés périodiquement avec le filtrat nous permettent de vérifier la porosité des filtres utilisés, car il ne devait y avoir aucune activité toxique, sinon il faut soustraire cette mortalité de celles obtenues avec le témoin et le retentat.

II.2.2.2 Matériel utilisé pour les essais biologiques

Les larves d'Aedes aegypti (Culicidae) sont reconnues comme organismes standards pour les essais biologiques (Rishikesh et Quélennec 1983). Cependant, pour nos expériences, nous avons choisi Aedes triseriatus, dont l'élevage est pratiqué dans les laboratoires du Groupe de Recherche sur les Insectes Piqueurs (G.R.I.P.) depuis plusieurs années. De plus, la sensibilité des larves d'Aedes triseriatus au B.t.i. est comparable à celle des larves d'Aedes aegypti.

L'élevage des moustiques se fait dans des cages de mousseline. Aedes triseriatus se développe à une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. L'humidité relative ($85\% \pm 15\%$) et la photopériode (18 heures de lumière, 6 heures d'obscurité) maintenues constantes, sont contrôlées automatiquement.

Tous les deux jours, nous donnions un repas de miel, et un repas sanguin est fourni par des souris; plus tard, les oeufs sont récupérés puis gardés humides pendant 15 jours pour faciliter l'éclosion. Après l'éclosion, les larves de premier stade sont transférées dans des bacs en plastique, et nourries avec du foie desséché. Au bout de 15 jours, les larves atteignent le quatrième stade, et sont finalement prêtes pour les essais biologiques. Les nymphes produites sont placées dans les cages, où elles donneront des adultes.

Nous utilisons des pots à urine de 125 mL en polypropylène (Fisher Brand) non stériles et autoclavables pour maintenir les larves pendant l'exposition au B.t.i.. Nous avons choisi ces contenants parce qu'ils sont peu coûteux, faciles à transporter et à entretenir.

L'absence de chlore dans l'eau servant pour les tests biologiques étant recommandée (WHO 1983), nous utilisons de l'eau distillée non déminéralisée.

II.2.2.3 Réalisation des tests biologiques

Le premier point à considérer est la sélection des larves testées. Elles doivent être au début du quatrième stade de développement, car à ce stade les larves étant plus faciles à reconnaître, nous pouvons aisément utiliser une population homogène. Aussi, il apparaît que lors de la phase initiale du quatrième stade, les larves peuvent ingérer plus de nourriture, donc s'intoxiquer plus facilement (Habib 1983). Plus tard au cours de la nymphose, les nymphes cessent de se nourrir et ne sont pas susceptibles de s'intoxiquer. L'âge affecte donc la mortalité des larves durant leur exposition aux toxines de B.t.i. (Wraight et al, 1981).

11.2.2.3.1 Détermination des fourchettes de la concentration

Ces tests préliminaires permettent de déterminer les concentrations pour lesquelles la mortalité des larves passe de 100% à 0%, facilitant ainsi les dilutions sérielles rapprochées lors des tests définitifs.

La suspension (témoin ou retentat de l'échantillon) est brassée vigoureusement pendant 20 minutes à l'aide d'un agitateur " va-et-vient" (Eberbach - Ann Arbor), puis 5 dilutions de 10 en 10 (1/10 à 1/100000) sont réalisées en ajoutant 10 mL de la suspension dans le premier pot, et en transférant successivement 10 mL dans les autres. Chaque pot contient au préalable 90 mL d'eau et 20 larves. Chaque dilution est éprouvée en triple exemplaires.

Les larves sont maintenues en contact avec l'échantillon à tester pendant 24 heures dans des chambres environnementales où la température est de 18°C. En effet, une variation de la température lors des différentes expériences peut affecter la mortalité des larves, car il existe une relation positive entre la mortalité et l'augmentation de la température (Sinègre et al, 1981).

II.2.2.3.2 Comptage de la mortalité

Après un temps de contact de 24 heures, on dénombre les larves vivantes et mortes, ainsi que les nymphes. A cause de la nécrophagie chez les larves, le nombre de larves mortes est calculé à partir du nombre de larves vivantes (nombre initial de larves moins le nombre de larves vivantes). Le dénombrement des nymphes permet de réajuster l'effectif exact des larves (nombre initial moins les nymphes). Si la nymphose dépasse 5%, l'expérience est rejetée et reprise, car cela indique que les larves utilisées ont dépassé le quatrième stade.

II.2.2.3.3 Tests définitifs

A partir des témoins et des concentrés, on prépare des suspensions de B.t.i. (de l'ordre de 1 L) à la concentration désirée. Cette concentration est fixée après les tests préliminaires. Puis, huit dilutions sérielles (0,65 en 0,65) sont réalisées avec ces suspensions. L'objectif de cette procédure est d'obtenir au moins deux pourcentages de mortalité de part et d'autre de 50% et différents de 0 ou 100%. Par exemple, si pour deux dilutions données (1/100 et 1/1000) des mortalités respectives de 100% et 0% avaient été enregistrées au cours des tests préliminaires, alors on effectue une série de dilutions (0,65 en 0,65) entre ces deux

points. Un volume (100 mL) de la suspension diluée reçoit 20 larves, et chaque dilution est éprouvée en triple exemplaires.

Il est important que les tests biologiques soient répétés sur trois jours consécutifs, afin de s'assurer de la constance du taux de mortalité pour une même dilution.

Le temps de contact avec le B.t.i. et le comptage de la mortalité sont les mêmes que précédemment.

11.2.2.4 Analyse statistique des tests biologiques

Les tests biologiques développés avec les larves de moustiques pouvant-être définis comme des modèles stochastiques indirects et qualitatifs (Hubert, 1984), nous permettent de mesurer la réponse (mort des larves de moustiques) en variant la concentration de l'insecticide.

Dans ces tests, nous comparons différentes préparations de concentration inconnue à un standard de concentration connue, afin de déterminer l'activité relative de chaque préparation.

De façon théorique, la représentation de la relation (pourcentage de mortalité-concentration) se traduit par une courbe sigmoïde asymétrique (avec un point d'inflexion situé sous le niveau 50%) reliant le pourcentage de réponse à la concentration du produit. Cependant en considérant le logarithme de la concentration, nous obtenons une sigmoïde

symétrique avec un point d'inflexion situé à 50%. Cette sigmoïde peut-être considérée comme la fréquence relative du nombre d'organismes répondant à chaque concentration. La distribution de ces fréquences suit une loi normale, que l'on note:

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

Z = densité de la distribution normale

X = variable aléatoire

la moyenne (μ) sera la concentration où 50% des organismes testés meurent et 50% survivent. L'écart type (σ), permettra de mesurer l'homogénéité de la population.

Afin de passer de la représentation sigmoïde symétrique à une représentation linéaire beaucoup plus accessible, se résumant à une simple droite du premier degré, nous utilisons une transformation mathématique (Finney, 1962), en posant:

$$Y = Z + 5$$

Y appelé "probit" est défini par la relation

$$(1) Y = a + bX$$

X = logarithme de la concentration

b = pente de la droite probit,

a = ordonnée à l'origine

Un programme d'analyse probit , écrit en Fortran IV, a été élaboré par Daum (1966, 1972). Ce programme établit une relation linéaire pondérée entre la mortalité exprimée en probit et le logarithme de la concentration, en employant le "Maximum Likelihood Procedure" (Finney, 1971). Récemment, un autre programme a été mis au point sur le progiciel SPSSX (Norusis, 1983).

Des résultats observés, il est possible à l'aide d'une droite de régression (2) $Y = a^* + b^* X$ calculée en utilisant la méthode pondérée, d'obtenir des coefficients approchés a^* et b^* .

De cette droite, nous pourrions déterminer la CL₅₀ (concentration létale 50) estimée de la solution par les équations:

$$(3) \quad M = \log (CL_{50}) = \frac{5 - a^*}{b^*}$$

$$(4) \quad CL_{50} = \text{antilog} (M) = 10^M$$

Afin de valider statistiquement la droite "probit" et la CL₅₀ obtenue, nous utilisons la distribution Khi-carré avec $k-2$ degré de liberté (k = nombre de dilutions) et un intervalle de confiance au seuil de 95%.

11.2.3 Calcul de l'efficacité relative d'une suspension.

Lors de l'utilisation d'une suspension de concentration inconnue et d'un standard, il est possible de calculer l'efficacité relative de l'une par rapport à l'autre, en procédant de la manière suivante:

$$\begin{aligned}\text{Soient: (5) } Y_s &= a_s^* + b_s^* X \quad (\text{standard}) \\ Y_i &= a_i^* + b_i^* X \quad (\text{inconnue})\end{aligned}$$

Des droites probits obtenues (Figure 6), nous pouvons calculer le coefficient de l'efficacité relative (ρ). Afin de faciliter les analyses statistiques, il est important de garder les mêmes intervalles de dilutions dans les deux cas.

En considérant que les deux droites sont parallèles (nous pouvons le vérifier) i.e. nous devons avoir les mêmes pentes, alors,

$$b_s^* = b_i^* = b^*.$$

$$\text{En général, (6) } R = \log(\rho) = \frac{Y_i - Y_s}{b^*} - X_i - X_s$$

où Y_i = la moyenne des valeurs probits avec l'inconnue

Y_s = la moyenne des valeurs probits avec le standard

X_i = logarithme de la dilution de l'inconnue

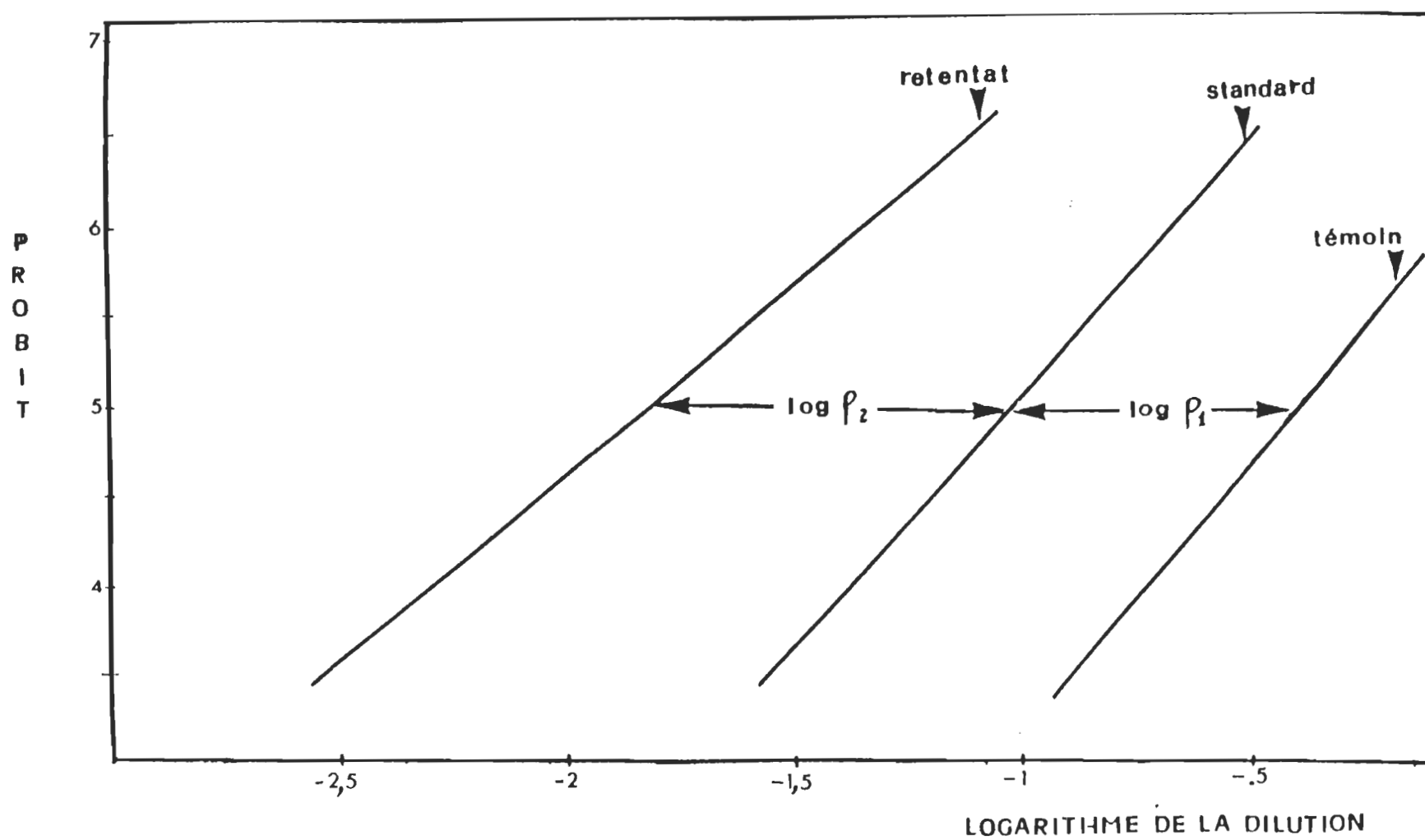


Figure 6. Détermination du coefficient d'activité relative.

X_s = logarithme de la dilution du standard
 b^* = la pente commune estimée.

L'exemple suivant illustre le mode de calcul. Si nous considérons que:

logarithme de la dilution du standard entraînant 50% de mortalité = $\log D_{50(S)} = -0,923$

logarithme de la dilution de la suspension inconnue entraînant 50% de mortalité = $\log D_{50(I)} = -0,284$,

nous obtenons que le logarithme du coefficient de

$$\begin{aligned} \text{l'efficacité relative } \log(P_1) = R_1 &= \log D_{50(S)} - \log D_{50(I)} \\ &= (-0,923) - (-0,284) \\ &= -0,639 \end{aligned}$$

$$P_1 = 10^{R_1} = 0,22955.$$

Sachant que la concentration du standard est de 5 mg.L^{-1} , il est possible de calculer la concentration de la suspension inconnue en posant:

$$\begin{aligned} \text{concentration inconnue} &= \text{concentration standard} \times P_1 \\ &= 5 \text{ mg.L}^{-1} \times 0,22955 = 1,148 \text{ mg.L}^{-1}. \end{aligned}$$

II.2.4 Détermination du pourcentage de récupération

Nous déterminons la concentration du retentat obtenu après ultrafiltration en procédant de manière similaire que précédemment.

Par exemple, en sachant que:

volume échantillon = 20 L

volume du concentré = 0,84 L

concentration du retentat = 26,29 mg.L⁻¹ obtenu

tel que décrit précédemment. Nous pouvons rapporter cette concentration sur 20 L,

$$\frac{26,29 \text{ mg.L}^{-1} \times 0,84 \text{ L}}{20 \text{ L}} = 1,104 \text{ mg.L}^{-1}$$

et calculer le pourcentage de récupération en posant:

$$\frac{\text{concentration du retentat (sur 20 L)}}{\text{concentration échantillon}} \times 100 = \frac{1,104}{1,148} \times 100 = 96,17\%$$

Les résultats des tests préliminaires en laboratoire ont été obtenus de la même manière.

11.2.5 Détermination de la longueur de perte

Deux étapes sont à considérer dans cette procédure:

la première étape consiste à effectuer une simulation en utilisant les paramètres de transport de la rhodamine, auxquels on associe la quantité d'insecticide et la durée

d'épandage de ce dernier. Nous utilisons pour cette prédiction des concentrations (concentrations attendues), un programme dénommé TRANSIM (Chalifour et al., 1985) basé sur la solution analytique de Khalig (1978) de l'équation unidimensionnelle de Taylor. La solution analytique permet de prédire les concentrations $c(x,t)$ à une station quelconque située à une distance x_i en aval de la station d'épandage x_0 pour laquelle la concentration $c(x_0,w)$ est connue en tout temps w .

$$c(x_i,t) = \exp \frac{-(x_i - x_0)}{x_R} \frac{1}{t_d} \int_0^t \exp \frac{-(a - b)^2}{4b} c(x_0,w) dw$$

$$\text{où } a = \frac{x_i - x_0}{x_d}$$

$$b = \frac{t - w}{t_d}$$

t_d = temps de dispersion (min)

x_d = longueur de dispersion (m)

x_R = longueur de perte (m).

La seconde étape consiste à calculer la longueur de perte de l'insecticide à partir des concentrations observées (déterminées après essais biologiques) et des concentrations attendues (déterminées à l'aide du programme TRANSIM). Si C_i est la concentration en x_i à un moment quelconque du passage de l'insecticide, la perte relative entre deux stations (x_0 et x_i) est définie par le quotient $[C_i]_{ATT} / [C_i]_{OBS}$, et est obtenue de la façon suivante:

$$[C_1]_{ATT} / [C_1]_{OBS} = \exp [(x_0 - x_1) / x_R].$$

Cependant, si $x_1 - x_0 = x_R$, l'expression devient:

$$[C_1]_{OBS} / [C_1]_{ATT} = \exp(-1) = 0.3679.$$

$[C_1]_{ATT}$ = concentration attendue à la station x_1 et calculée à partir du programme TRANSIM.

$[C_1]_{OBS}$ = concentration observée à la station x_1 , déterminée après des tests biologiques.

La longueur de perte (x_R) de l'insecticide correspond donc à la distance à laquelle il reste 37% de la concentration initiale de l'activité de l'insecticide.

L'exemple suivant illustre le mode de calcul que nous utilisons pour déterminer la longueur de perte;

soient $1,828 \text{ mg.L}^{-1}$ = concentration attendue $[C_1]_{ATT}$

et $1,148 \text{ mg.L}^{-1}$ = concentration observée $[C_1]_{OBS}$ à une station située à 300 m (x_1) de la station d'épandage. La longueur de perte (x_R) à partir de la station d'épandage est

$$x_R (0-1) = \frac{x_1 - x_0}{\ln \frac{[C_1]_{ATT}}{[C_1]_{OBS}}} = \frac{300 - 0}{\ln \frac{1,828}{1,148}} = 644,88 \text{ m}$$

x_1 = distance de la station 1 à partir de la station d'épandage

x_0 = station d'épandage.

Cependant, si nous voulons calculer la longueur de perte entre deux stations consécutives, nous utilisons un facteur de proportionnalité, et procédons de la manière suivante:

Soient 2 stations adjacentes (1 et 2)

$$[C_1]_{\text{OBS}} \times \frac{[C_2]_{\text{ATT}}}{[C_1]_{\text{ATT}}} = [C_2]'_{\text{ATT}}$$

$$X_{R(1-2)} = \frac{x_2 - x_1}{\ln \frac{[C_2]'_{\text{ATT}}}{[C_2]_{\text{OBS}}}}$$

$[C_2]_{\text{ATT}}$ = concentration attendue (programme TRANSIM) à partir de la station d'épandage

$[C_2]'_{\text{ATT}}$ = concentration attendue à partir de la station 1

x_2 = distance de la station 2 à partir de la station d'épandage.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 8 et 9 et ont été obtenus de la manière suivante:

soient $1,828 \text{ mg.L}^{-1}$ = concentration attendue $[C_1]_{\text{ATT}}$

et $1,148 \text{ mg.L}^{-1}$ = concentration observée $[C_1]_{\text{OBS}}$

à une distance $x_1 = 300 \text{ m}$,

soient $2,724 \text{ mg.L}^{-1}$ = concentration attendue $[C_2]_{\text{ATT}}$

et $0,925 \text{ mg.L}^{-1}$ = concentration observée $[C_2]_{\text{OBS}}$

à une distance $x_2 = 520 \text{ m}$,

$$\text{donc } [C_2]'_{\text{ATT}} = 1,148 \times \frac{2,724}{1,828} = 1,711 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{et } X_R (1 \rightarrow 2) = \frac{520 - 300}{\ln \frac{1,711}{0,925}} = 357,72 \text{ m.}$$

CHAPITRE III

RESULTATS

III.1 Tests préliminaires en laboratoire

Le tableau 4 représente les résultats d'ultrafiltration et d'analyse probit des tests biologiques de suspensions de Teknar^R (5, 15 et 100 mg.L⁻¹). Ces suspensions ont été préparées avec de l'eau distillée non déminéralisée ou de l'eau de ruisseau. Nous avons fait varier le nombre de filtres, tandis que les autres paramètres contenus dans ce tableau ont été calculés comme mentionnés à la section II. Les autres facteurs tels la pression et la vitesse d'écoulement influençant peu ou pas le pourcentage de récupération ont été maintenus dans les mêmes conditions.

On observe sur ce tableau une variation du pourcentage de récupération en fonction du nombre de filtres utilisés. De 35% avec six filtres, le pourcentage de récupération atteint 87% avec dix filtres pour la même concentration (ED₁ et ED₃) et une variation de la concentration (ED₂) n'améliore pas le

Tableau 4

Résultats des tests préliminaires effectués en laboratoire

Ech.	témoin (mg.L ⁻¹)	facteur de réduction du volume	retentat (mg.L ⁻¹)*	% récupération	nombre filtres
ED ₁	15	32,50	4,63	31	6
ED ₂	100	39,00	84,86	85	10
ED ₃	15	35,45	13,00	87	10
ER ₁	5	18,81	4,42	88	10
ER ₂	5	24,20	3,87	78	10

Ech. = échantillon

ED = eau distillée non déminéralisée

ER = eau de ruisseau

* = concentration du retentat rapportée sur le volume de l'échantillon filtré

rendement. Lorsque les suspensions sont préparées avec de l'eau de ruisseau (ER_1 et ER_2) nous obtenons des pourcentages de récupération comparables à ceux de ED_2 et ED_3 . Ce qui semble exclure la possibilité d'une relation entre le pourcentage de récupération et la provenance de l'eau ou la concentration de la suspension dans les limites testées. Dans ce cas, une correction pour le pourcentage de récupération n'est pas nécessaire car nous comparons des retentats d'échantillons avec des retentats de standard. De plus, la meilleure récupération avec dix filtres, nous a amené à choisir ce nombre de filtres pour l'ultrafiltration des échantillons de terrain.

III.2 Traçage à la rhodamine.

III.1.1 Analyse des courbes de rhodamine

De façon générale le déplacement de la rhodamine le long du cours d'eau (figures 7 et 8) est représenté par une courbe caractérisée par une partie ascendante, correspondant à une montée rapide de la concentration. La concentration augmente, atteint un plateau, puis décline lentement et devient presque linéaire dans les pieds de courbe. Dans la rivière aux BETES PUANTES (Figure 7), on observe des plateaux de longues durées (présence d'un plateau de 20 minutes même à 1200 m en aval du point d'épandage) et la baisse de la concentration de

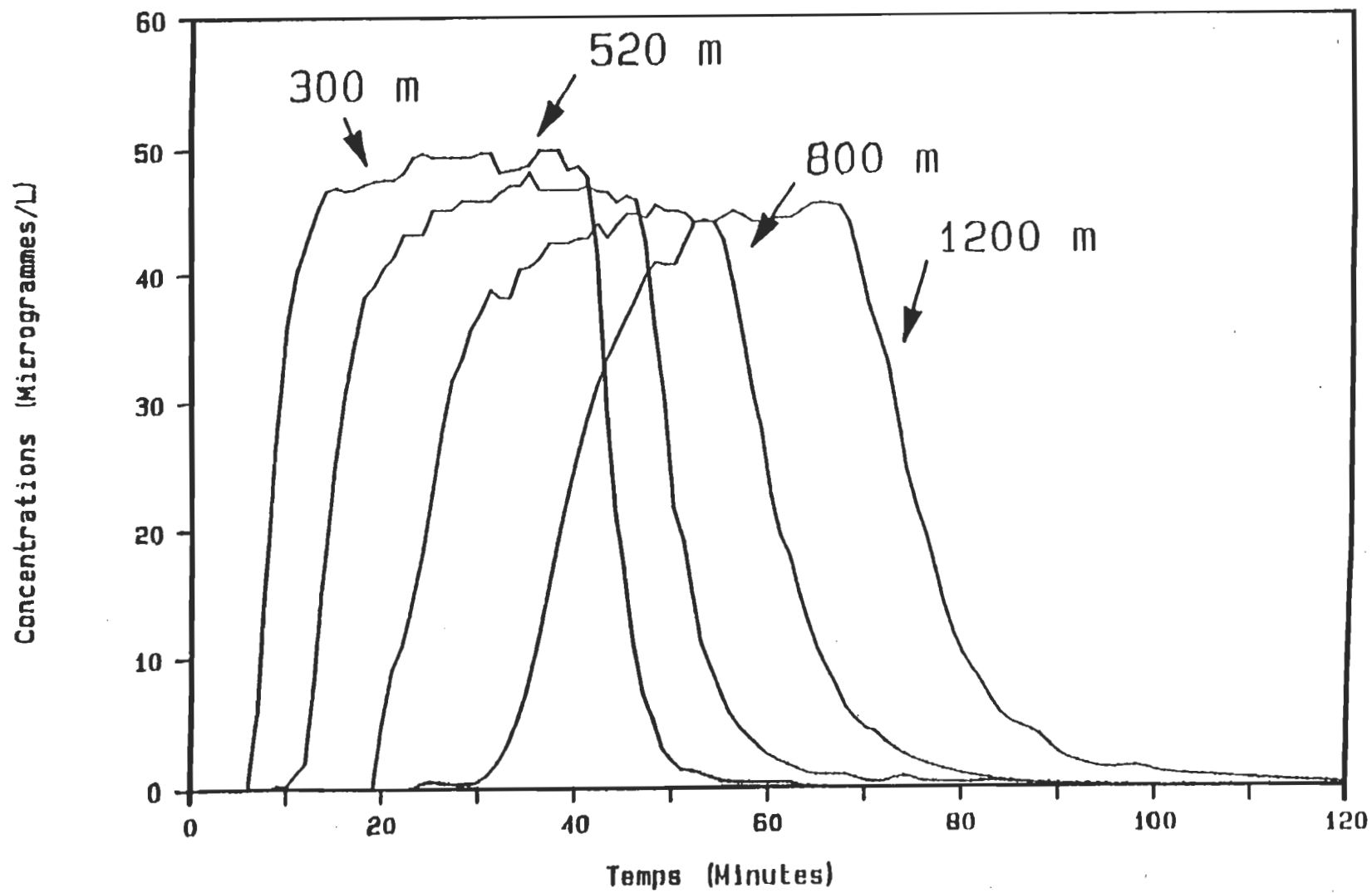


Figure 7. Courbe de la concentration de rhodamine en fonction du temps de prélèvement de l'échantillon (rivière aux BETES PUANTES).

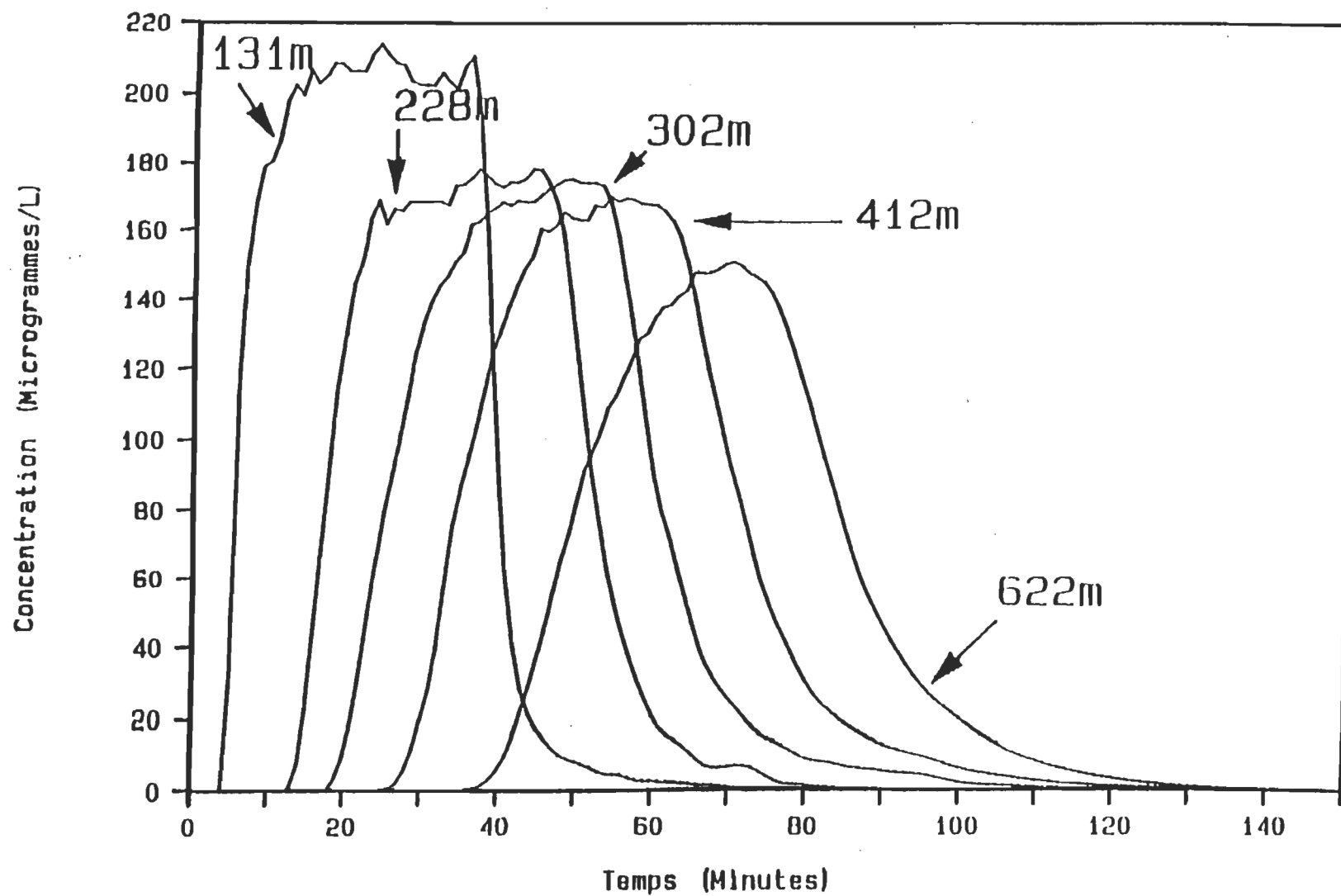


Figure 8. Courbe de la concentration de rhodamine en fonction du temps de prélèvement de l'échantillon (ruisseau du petit lac FRASER).

rhodamine se fait plus lentement d'une station à l'autre.

En revanche, pour le ruisseau du petit lac FRASER (figure 8) on observe sur de courtes distances (ex: station 131 m), une onde presque carrée, c'est à dire que le produit est présent dans le milieu momentanément en quantité fixe pour un temps précis. Les plateaux se raccourcissent et sont de courtes durées. Par exemple pour presque'un même temps d'épandage que dans la rivière aux BETES PUANTES, on note l'absence d'un plateau à 622 m. La hauteur des plateaux dépend de la quantité de produit injecté et de la durée de l'épandage.

III.2.2 Paramètres de transport

Les tableaux 5 et 6 représentent les paramètres de transport obtenus aux différentes sections lors du traçage à la rhodamine. Ces tableaux donnent la dose unitaire, le débit, la vitesse moyenne de déplacement et le temps de dispersion. Le débit et la vitesse moyenne de déplacement (rivière aux BETES PUANTES) indiquent de faibles variations (en moyenne 3%) entre les différentes sections. Ceci veut dire que la vitesse est presque constante le long du cours d'eau et que la mesure du débit est précise. Le temps de dispersion présente des variations autour d'une moyenne de 20%, tandis que la dilution de la rhodamine entraîne peu de

Tableau 5

Paramètres de transport (rivière aux BETES PUANTES)

Section	Dose unitaire (mg.s.L ⁻¹)	Débit (L.s ⁻¹)	Vitesse moyenne (m.s ⁻¹)	Temps de dispersion (min)
0	103,70*	1350*		
1	103,41	1353,88	0,44	1,41
2	100,22	1396,88	0,47	1,84
3	97,58	1443,69	0,47	1,28
4	100,02	1399,61	0,46	1,33

Station 0 = station d'épandage

* = valeur extrapolée

Tableau 6

Paramètres de transport (ruisseau du petit lac FRASER)

Section	Dose unitaire (mg.s.L ⁻¹)	Débit (L.s ⁻¹)	Vitesse moyenne (m.s ⁻¹)	Temps de dispersion (min)
0	422,53*	142*		
1	420,57	142,66	0,28	1,84
2	371,50	161,51	0,18	1,31
3	378,66	158,45	0,17	1,90
4	381,44	157,30	0,17	1,67
5	338,14	177,44	0,19	1,36

Station 0 = station d'épandage

* = valeur extrapolée

III.3 Traçage au B.t.i.

III.3.1 Ultrafiltration

Les tableaux (7 et 8), représentent les résultats obtenus après ultrafiltration. Pour chaque groupe, le tableau donne la station de prise d'échantillon, le volume d'eau soumis à l'ultrafiltration, le volume de rétention et le facteur de réduction du volume. Chaque échantillon (de l'ordre de 20 L) soumis à l'ultrafiltration pendant 45 à 60 minutes a été concentré près de 20 fois. Le témoin et le retentat de chaque échantillon ont été soumis à des tests biologiques sur larves de moustiques.

III.3.2 Analyse des tests biologiques

Les résultats essentiels des analyses sont contenus dans les tableaux 9 et 10. Les valeurs caractéristiques sont calculées sur ordinateur (programme analyse-probit, logiciel SPSSX de Norusis, 1983) et l'intervalle de confiance, calculé sur la CL_{50} correspond à une probabilité de 95%.

Les résultats des tests biologiques sont dans l'ensemble homogènes (khi-carré non significatif). Les quotients Max/Min $< 1,5$ (Ibarra et al, 1987) indiquent une précision satisfaisante sur les CL_{50} . Les lignes de régression correspondant aux mortalités enregistrées lors des tests

changement (0,3%) de la dose unitaire (aire sous la courbe à chaque station). La hausse de la dose enregistrée par exemple à la station 4 est due à une erreur de mesure de l'échantillon.

Les variations des paramètres de transport (ruisseau du petit lac FRASER) sont plus importantes et elles se situent autour d'une moyenne de 5% des mesures de débit et de dose unitaire, de 17% de la vitesse moyenne et de 23% du temps de dispersion. Dans tous les cas, les paramètres varient beaucoup plus dans le ruisseau du petit lac FRASER que dans la rivière aux BETES PUANTES.

Lorsque nous comparons les deux cours d'eau, nous constatons que la mesure du débit et la vitesse moyenne dans la rivière aux BETES PUANTES (débit de 1350 L.s^{-1} ; vitesse moyenne de $0,44 \text{ m.s}^{-1}$) sont plus élevées que dans le ruisseau du petit lac FRASER (débit de 142 L.s^{-1} ; vitesse de $0,20 \text{ m.s}^{-1}$). En revanche, les temps de dispersion montrent une proportion inverse (1,4 minute pour la rivière aux BETES PUANTES et 1,8 minute pour la ruisseau du petit lac FRASER).

Tableau 7

Résultats de l'ultrafiltration (rivière aux BETES PUANTES)

station	volume filtré (L)	volume de rétention (L)	facteur de réduction du volume (1)
1 (300 m)	20	0,84	23,81
2 (520 m)	20	0,94	21,28
3 (800 m)	20	1,11	18,02
4 (1200 m)	20	0,65	30,53
standard 5mg.L ⁻¹	19 (2)	0,78	24,20

temps de filtration: 45 à 60 minutes

nombres de filtres utilisés: 10

surface de filtration = 0,5 m² (0,05 m²/filtre)

diamètre des pores: 0,45µm

$$(1) X = \frac{20 \text{ L}}{0,84 \text{ L}} = 23,81$$

(2) 20 L - 1 L pour le témoin

Tableau 8

Résultats de l'ultrafiltration
(ruisseau du petit lac FRASER)

station	volume filtré (L)	volume de rétention (L)	facteur de réduction du volume (1)
1 (131 m)	20	1,00	20,00
2 (228 m)	20	0,86	23,26
3 (302 m)	19	0,76	25,00
4 (412 m)	20	0,77	25,81
5 (622 m)	20	0,96	20,83
standard 5mg.L ⁻¹	19 (2)	1,01	18,81

temps de filtration : 45 à 60 minutes

nombre de filtres utilisés: 10

surface de filtration = 0,5 m² (0,05 m²/filtre)

diamètre des pores: 0,45µm

$$(1) X = \frac{20 \text{ L}}{0,86 \text{ L}} = 23,26$$

(2) 20 L - 1 L pour le témoin

Tableau 9

Résultats de l'analyse probit des tests biologiques
(rivière aux BETES PUANTES)

Station	N	CL ₅₀	Max/Min	Pente	SE	Khi-carré	
1	T	3	2,57	1,25	3,05	0,18	5,69 (NS)
	R	3	0,10	1,37	2,28	0,15	14,79 (NS)
2	T	3	3,29	1,28	2,99	0,19	2,17 (NS)
	R	3	0,18	1,34	2,73	0,18	1,58 (NS)
3	T	3	3,56	1,32	2,92	0,19	4,50 (NS)
	R	3	0,22	1,30	2,56	0,16	4,66 (NS)
4	T	--	-----	-----	-----	-----	-----
	R	3	0,29	1,29	2,56	0,15	4,91 (NS)

T = témoin

R = retentat

N = nombre de répliques

CL₅₀ = concentration létale 50% (mg.L⁻¹)

Max/Min = quotient des limites de l'intervalle de confiance de la CL₅₀

NS = Khi-carré non significatif

SE = erreur standard sur la pente

Tableau 10

Résultats de l'analyse probit des tests biologiques
(ruisseau du petit lac FRASER)

Station	N	CL ₅₀	Max/Min	Pente	SE	Khi-carré	
1	T	3	0,13	1,27	2,76	0,16	3,11 (NS)
	R	3	0,02	1,24	3,26	0,19	9,29 (NS)
2	T	3	0,40	1,27	2,99	0,18	5,26 (NS)
	R	3	0,02	1,28	2,85	0,18	5,40 (NS)
3	T	3	0,83	1,28	2,89	0,18	2,41 (NS)
	R	3	0,06	1,29	2,96	0,20	2,35 (NS)
4	T	3	1,31	1,36	2,70	0,18	2,45 (NS)
	R	3	0.09	1,29	2,80	0,18	3,98 (NS)
5	T	3	2,35	1,36	2,94	0,20	1,79 (NS)
	R	3	0,11	1,24	3,22	0,19	10,43 (NS)

T = témoin

R = retentat

N = nombre de répliques

CL₅₀ = concentration létale 50% (mg.L⁻¹)

Max/Min = quotient des limites de l'intervalle de confiance de la CL₅₀

NS = Khi-carré non significatif

SE = erreur standard sur la pente

biologiques sont parallèles. La pente et l'erreur standard varient très peu entre le témoin et son retentat. Ceci suggère que l'ultrafiltration n'a pas modifié les propriétés toxiques du B.t.i..

III.3.3 Concentration comparée des témoins et des retentats

Les données d'expériences contenues dans les tableaux 11 et 12 donnent la station de prise d'échantillon, la concentration en mg.L^{-1} de Teknar^R du témoin et du retentat et le pourcentage de récupération. Ces résultats ont été obtenus en suivant l'exemple de calcul comme mentionné à la section II.2.4.

Pour la rivière aux BETES PUANTES, les valeurs des retentats sont très rapprochées de celles des témoins. Ce qui veut dire que le pourcentage de récupération est élevé (de l'ordre de 90%). A la station 4 (1200 m) la concentration du témoin étant sub létale, nous n'avons pas pu la mesurer par des tests biologiques. Par conséquent, il nous était impossible de calculer le pourcentage de récupération.

En revanche, le faible pourcentage de récupération enregistré avec les échantillons du ruisseau du petit lac FRASER (de l'ordre de 70%) crée de plus grandes variations entre les témoins et les retentats.

Tableau 11

Calcul des concentrations après analyse probit
(rivière aux BETES PUANTES)

station	témoin (mg.L ⁻¹)	retentat (mg.L ⁻¹) (*)	% de récupération ou rendement (%)
1 (300 m)	1,15	1,10	96,2
2 (520 m)	0,93	0,79	85,2
3 (800 m)	0,75	0,66	88,0
4 (1200 m)	----	0,34	
standard 5 mg.L ⁻¹	5,00	4,52	90,4

--- concentration sublétales impossible à déterminer après analyse probit

(*) concentration du retentat rapportée sur le volume de l'échantillon filtré.

Tableau 12

Calcul des concentrations après analyse probit
(ruisseau du petit lac FRASER)

station	témoin (mg.L ⁻¹)	retentat (mg.L ⁻¹) (*)	% de récupération ou rendement (%)
1 (131 m)	22,22	10,68	48,0
2 (228 m)	7,72	5,94	77,0
3 (302 m)	3,63	2,19	60,4
4 (412 m)	2,21	1,34	60,7
5 (622 m)	1,28	1,29	101
standard 5 mg.L ⁻¹	5,00	3,85	76,9

(*) concentration du retentat rapportée sur le volume de l'échantillon filtré.

III.3.4 Analyse de la perte de B.t.i. dans les cours d'eau étudiés

Les pertes de concentration du B.t.i. calculées en comparant les concentrations attendues calculées à partir des courbes de rhodamine (Programme TRANSIM) et les concentrations observées (calculées après analyse probit) sont consignés dans les tableaux 13 à 14 et les figures 9 à 17 sont les représentations graphiques du phénomène. Dans la rivière aux BETES PUANTES, la perte du B.t.i. se situe autour d'une moyenne de 58% et pour une section de 500 m (station 1 à station 3) elle est égale à 65%. En revanche dans le ruisseau du petit lac FRASER, la perte est beaucoup plus importante (autour d'une moyenne de 79%) et pour une section de 320 m (station 3 à station 5) elle est égale à 72%. La station 1 (131 m) est la seule où aucune perte n'a été enregistrée.

D'autre part, nous pouvons déterminer la dose unitaire enregistrée à chaque station (tableau 15 et 16). De façon générale, on note une baisse exponentielle de la dose de l'amont vers l'aval (figures 18 et 19). Dans la rivière aux BETES PUANTES, la perte d'une station à l'autre est en moyenne de 33% (témoins) et 37% (retentats), tandis que dans le ruisseau du petit lac FRASER, elle est plus importante

Tableau 13

Perte de la concentration deB.t.i.
(rivière aux BETES PUANTES)

Station	concentration attendue (mg.L ⁻¹)	concentration observée (mg.L ⁻¹)	% perte
1	1,828	1,148	37
2	2,724	0,925	66
3	2,514	0,745	70
4	2,544	*	

* = concentration sublétales

N.B. Les échantillons des stations 1 et 3 ont été pris avant les plateaux, ce qui a créé les valeurs anormalement basses des concentrations attendues à ces stations.

Tableau 14

Perte de la concentration de B.t.i.
(ruisseau du petit lac FRASER)

Station	concentration attendue (mg.L ⁻¹)	concentration observée (mg.L ⁻¹)	% perte
1	19,707	22,222	(1)
2	19,592	7,721	60
3	19,227	3,623	81
4	19,074	2,213	82
5	17,537	1,277	97

(1) concentration attendue inférieure à concentration observée, ce qui veut dire qu'il n'y a pas eu de perte.

RIVIERE AUX BETES PUANTES (TEMOIN)

TRAÇAGE AU B.t.1. (STATION 1 - 300 m)

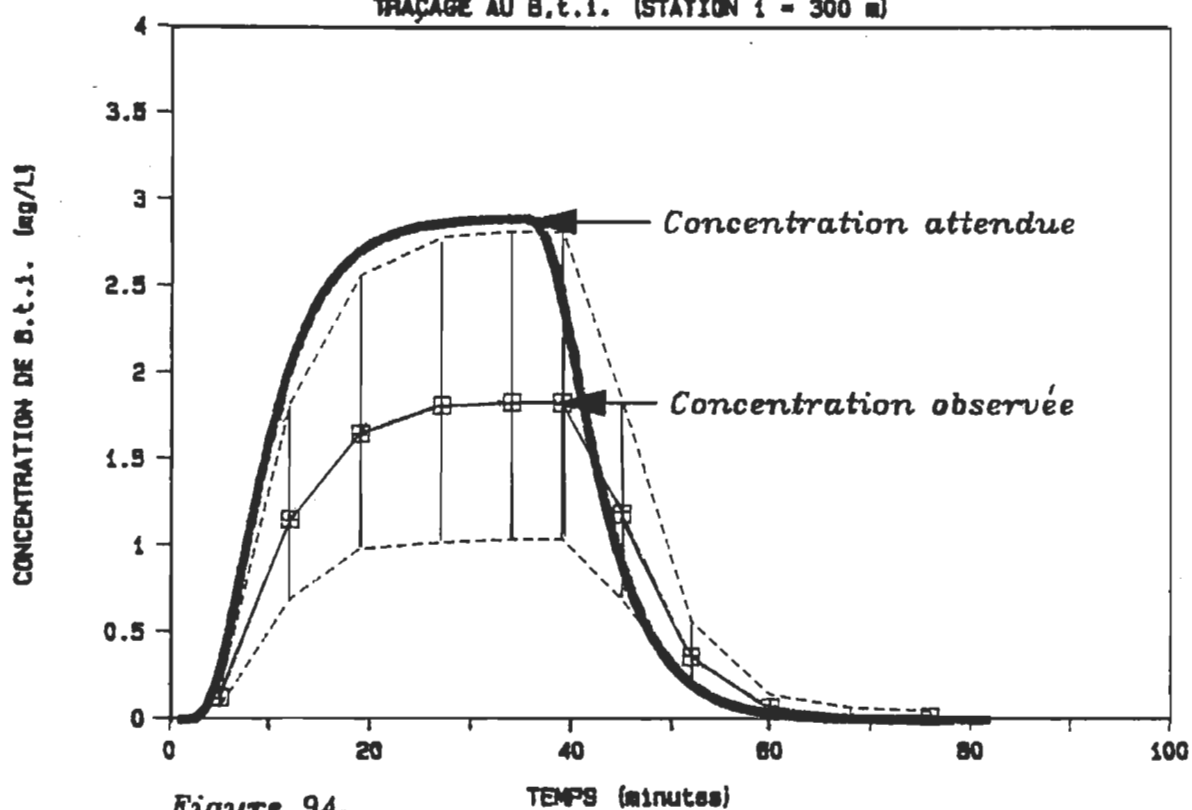


Figure 9A.

RIVIERE AUX BETES PUANTES (RETENTAT)

TRAÇAGE AU B.t.1. (STATION 1 - 300 m)

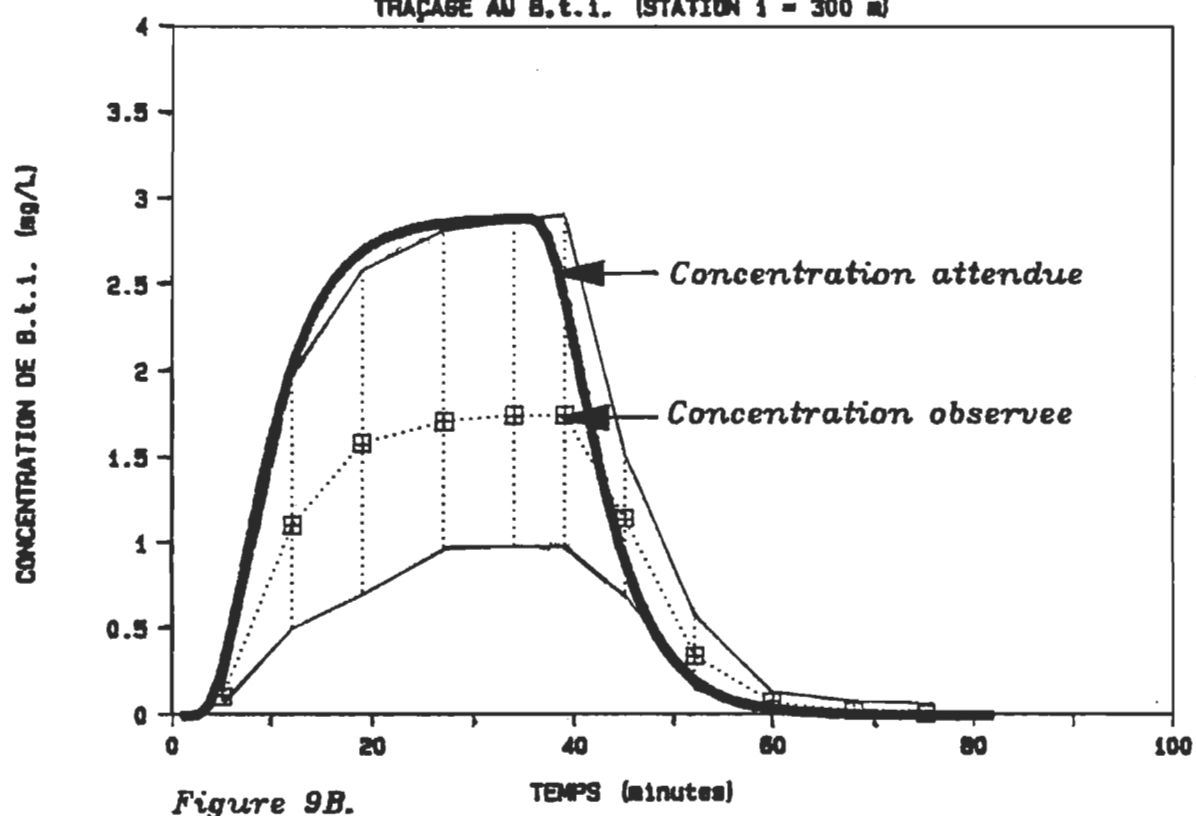


Figure 9B.

RIVIERE AUX BETES PUANTES (TEMOIN)

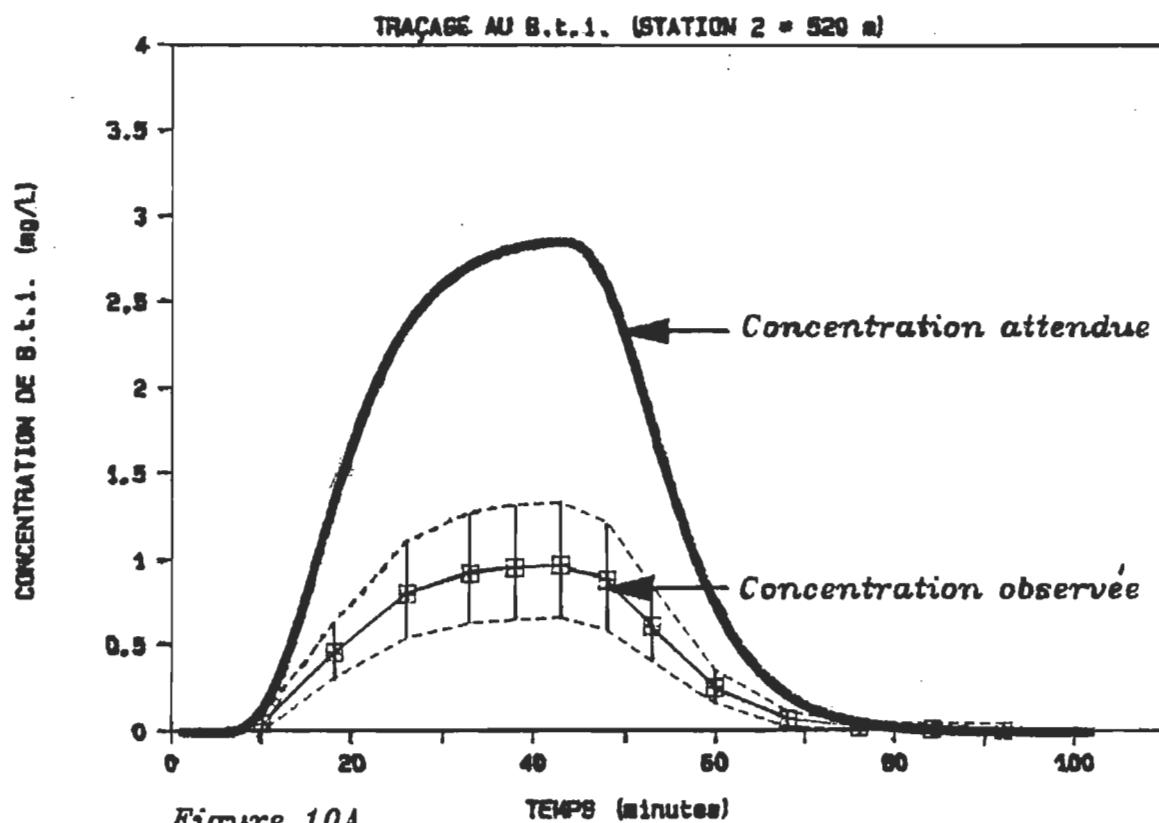


Figure 10A.

RIVIERE AUX BETES PUANTES (RETENTAT)

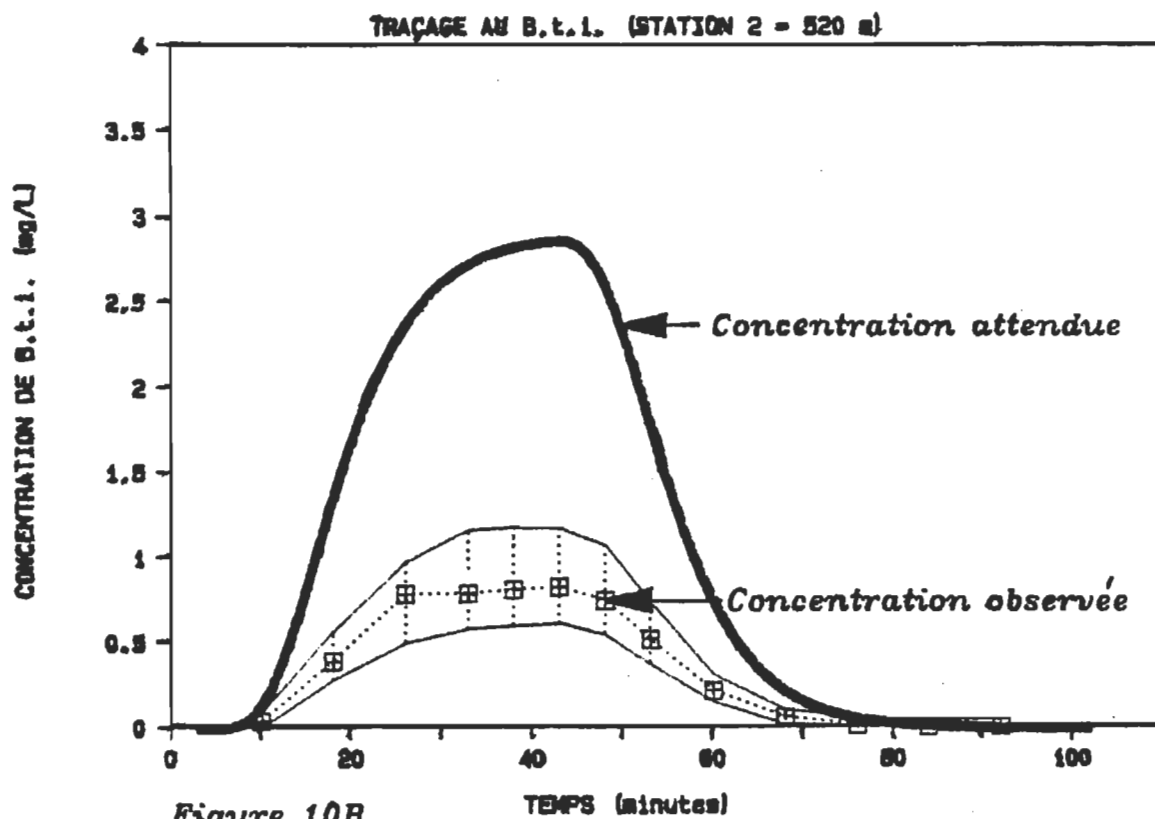


Figure 10B.

RIVIERE AUX BETES PUANTES (TEMOIN)

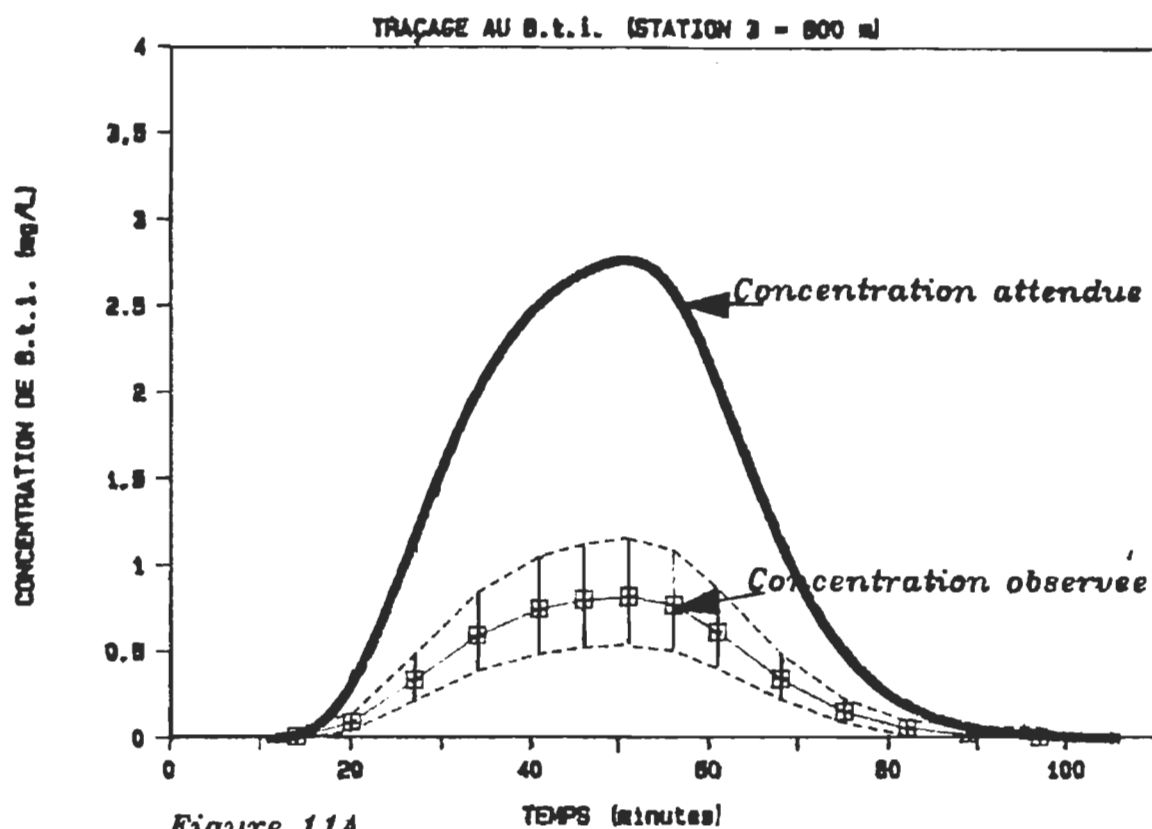


Figure 11A.

RIVIERE AUX BETES PUANTES (RETENTAT)

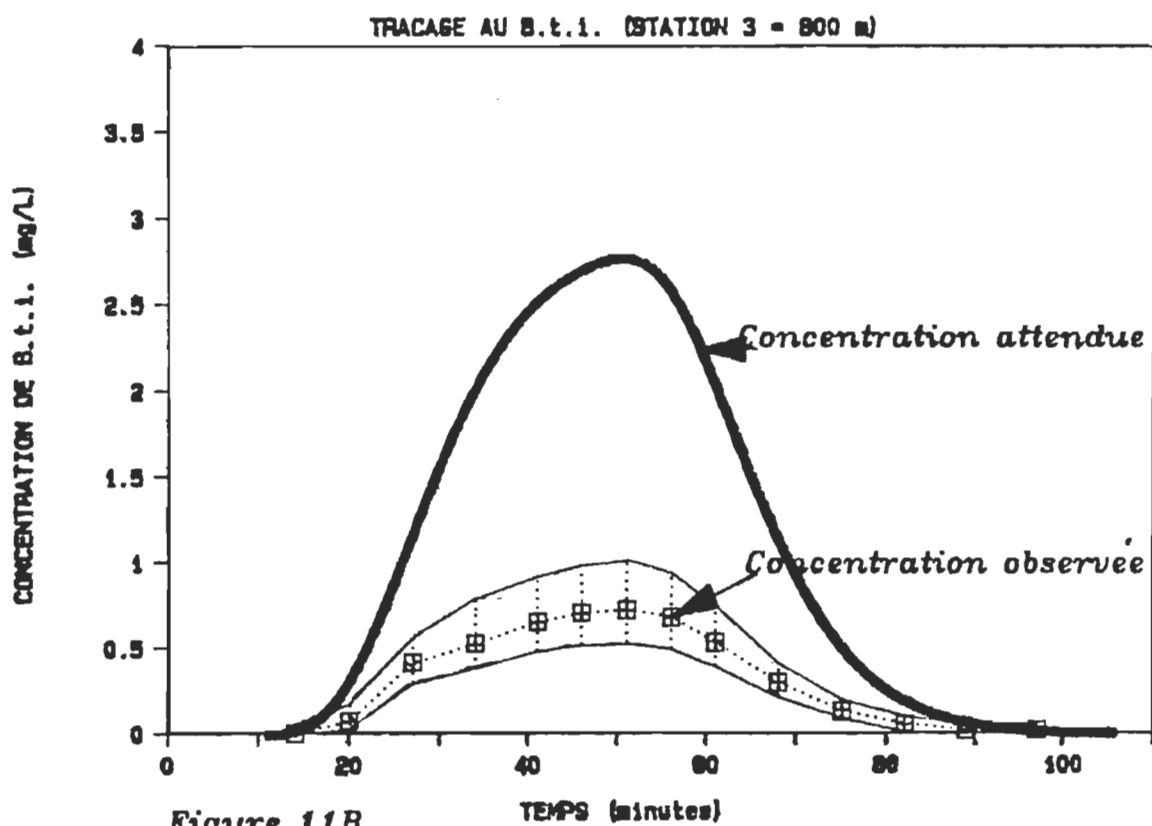


Figure 11B.

RIVIERE AUX BETES PUANTES (RETENTAT)

TRAÇAGE AU B.t.l. STATION 4 = 1200 m)

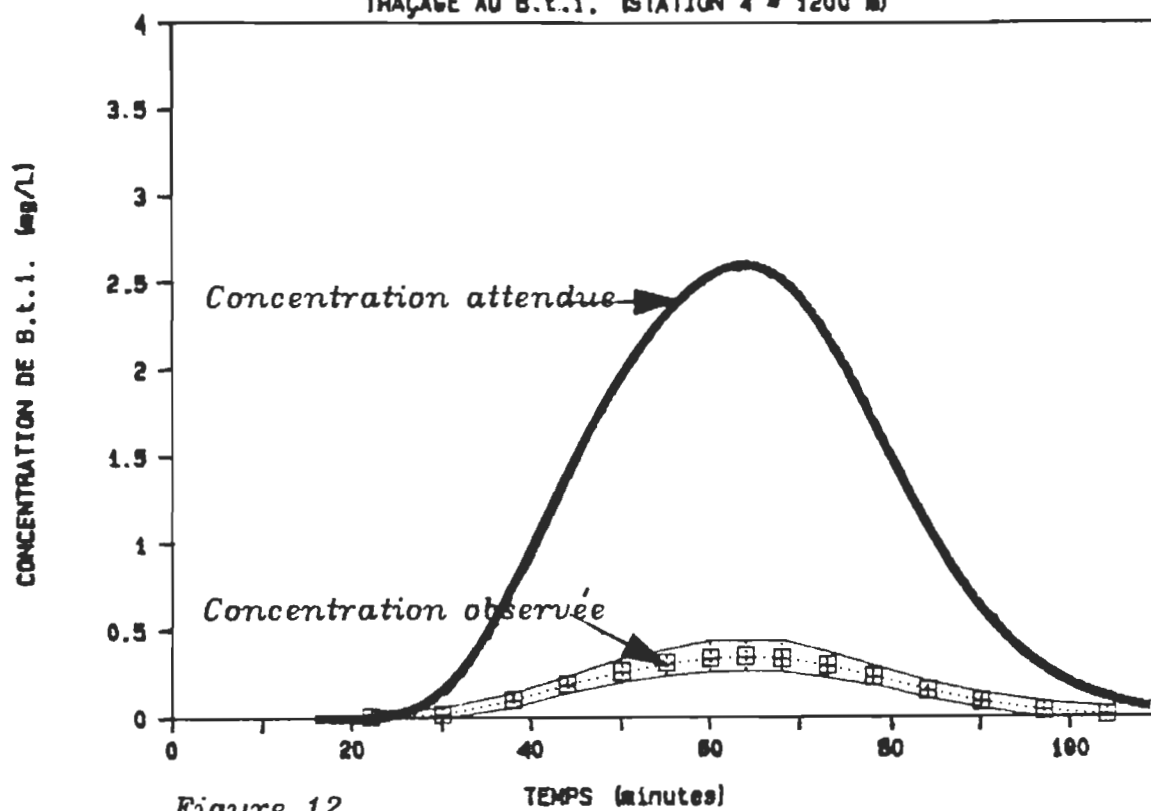


Figure 12.

RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (TEMOIN)

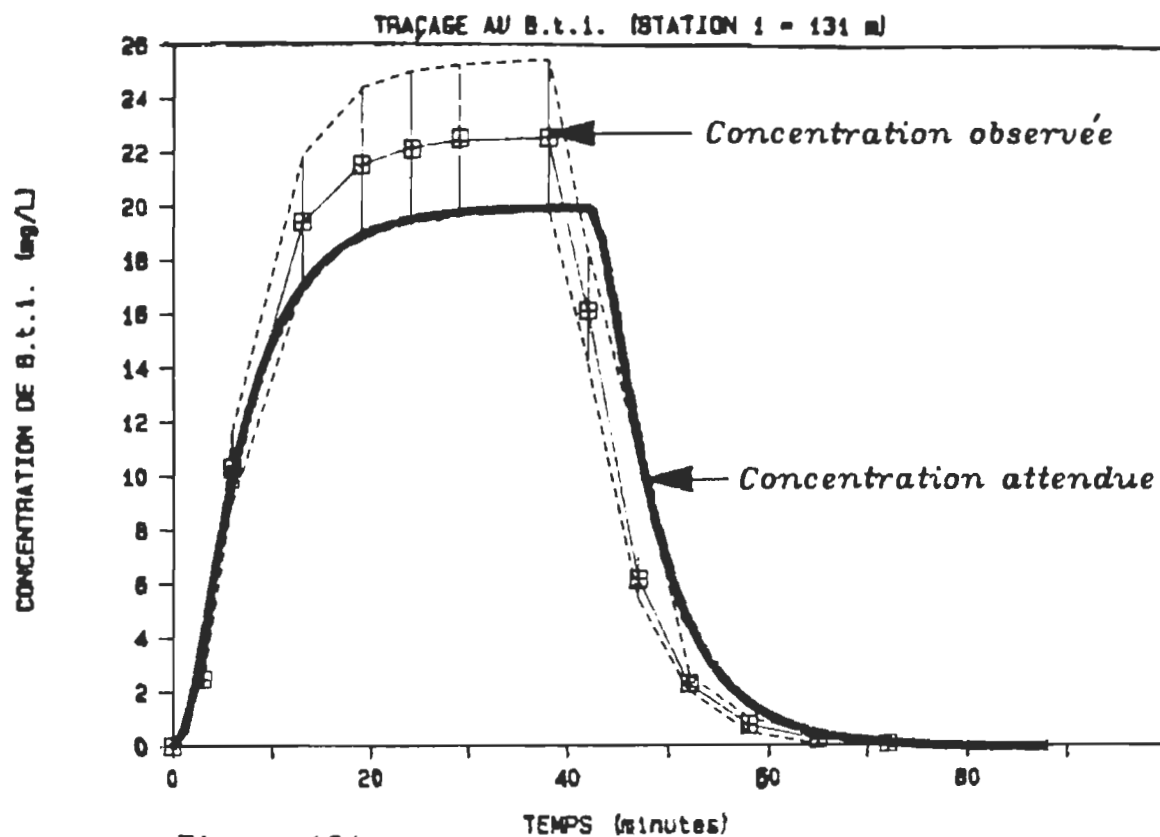


Figure 13A.

RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (RETENTAT)

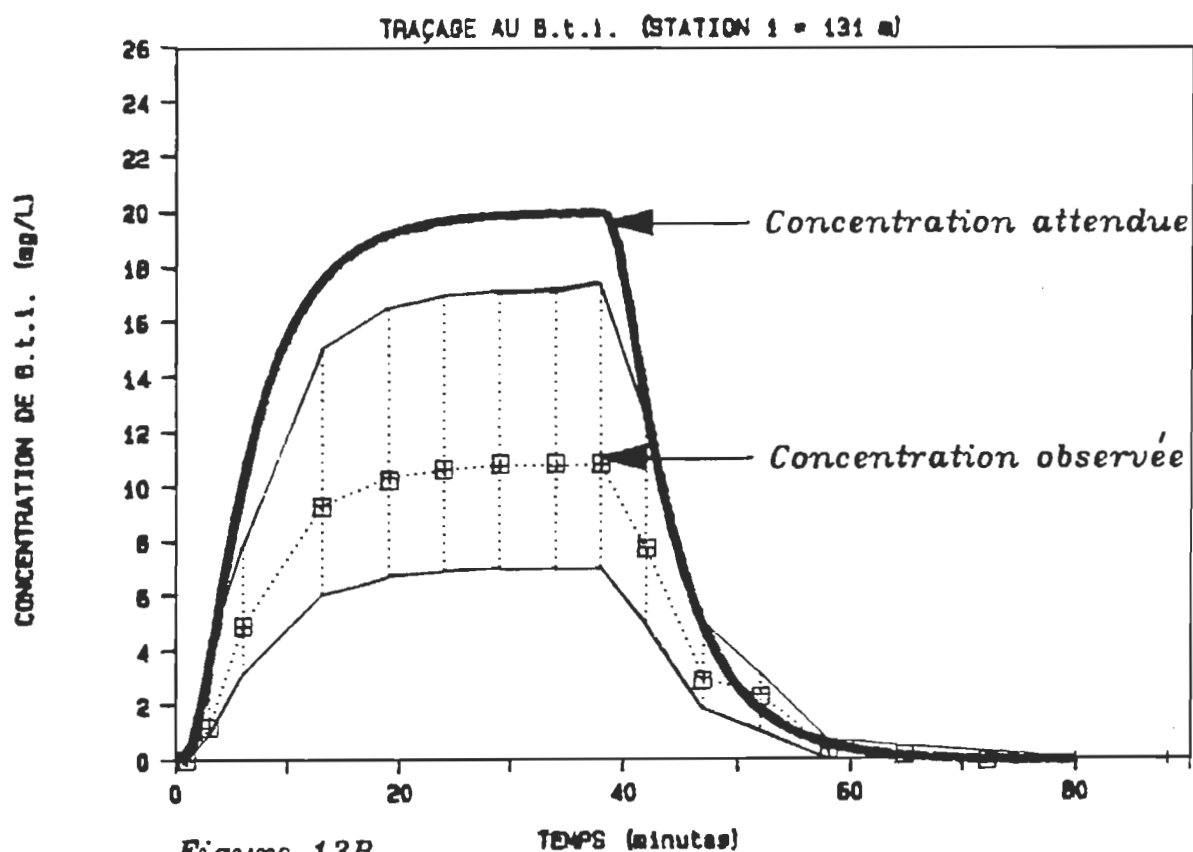


Figure 13B.

RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (TEMPOIN)

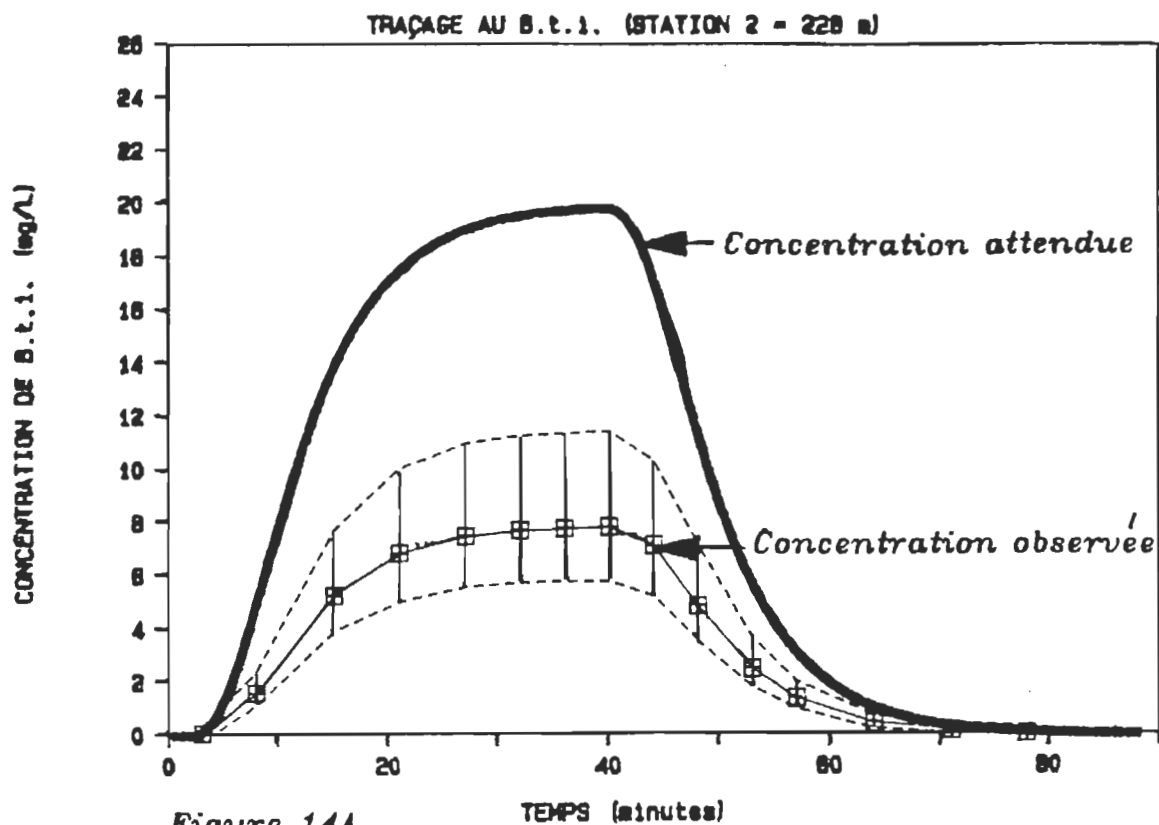


Figure 14A.

RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (RETENTAT)

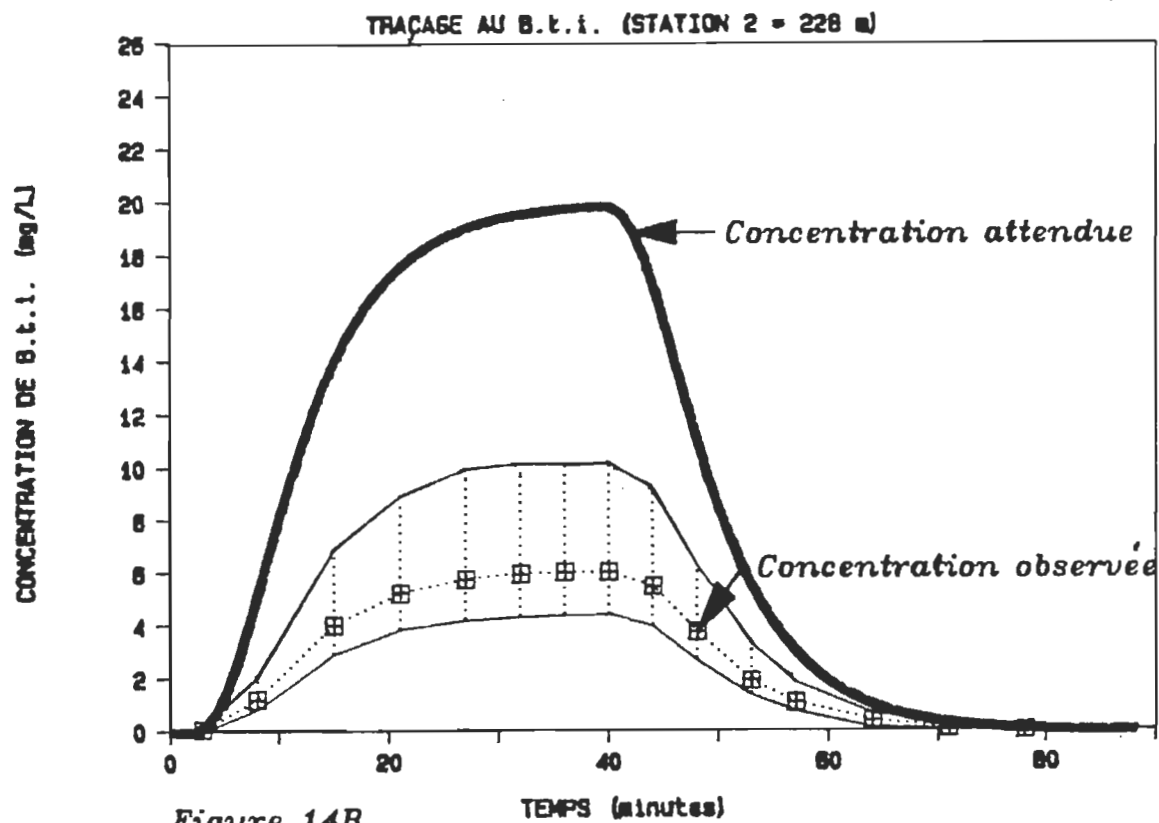


Figure 14B.

RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (TEMOIN)

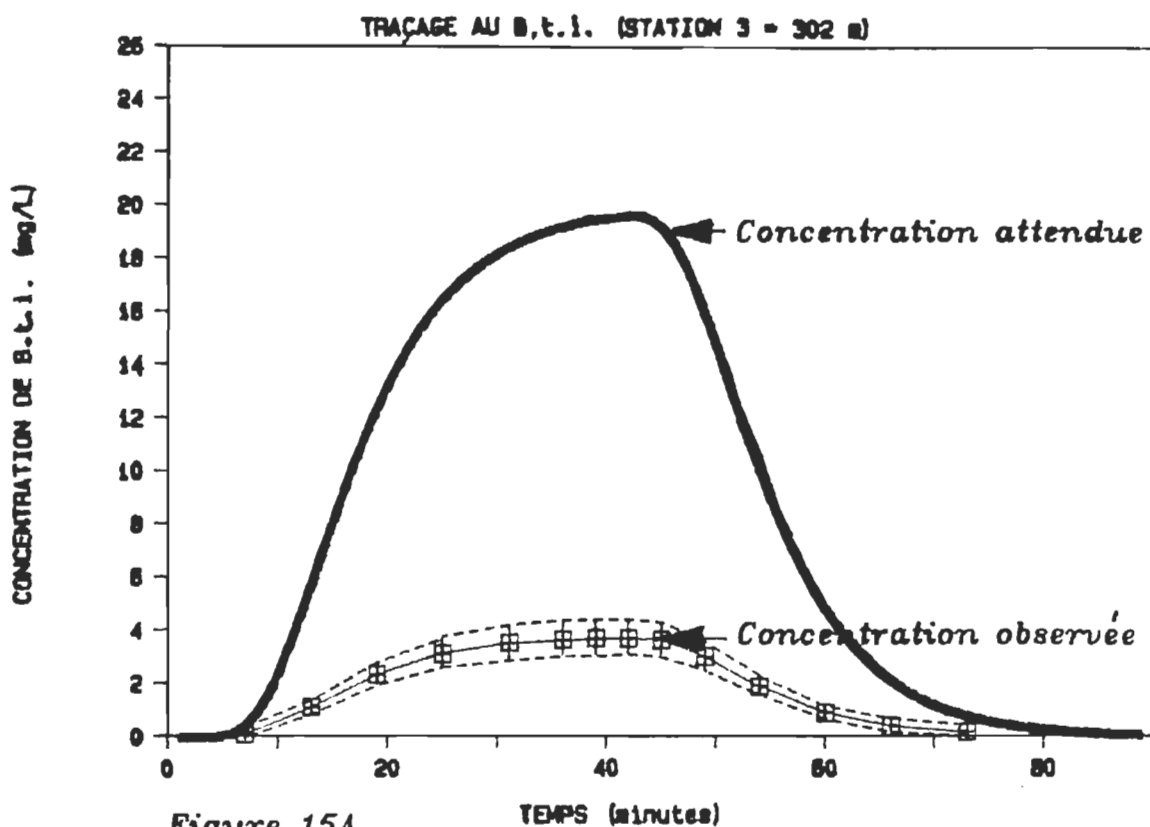


Figure 15A.

RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (RETENTAT)

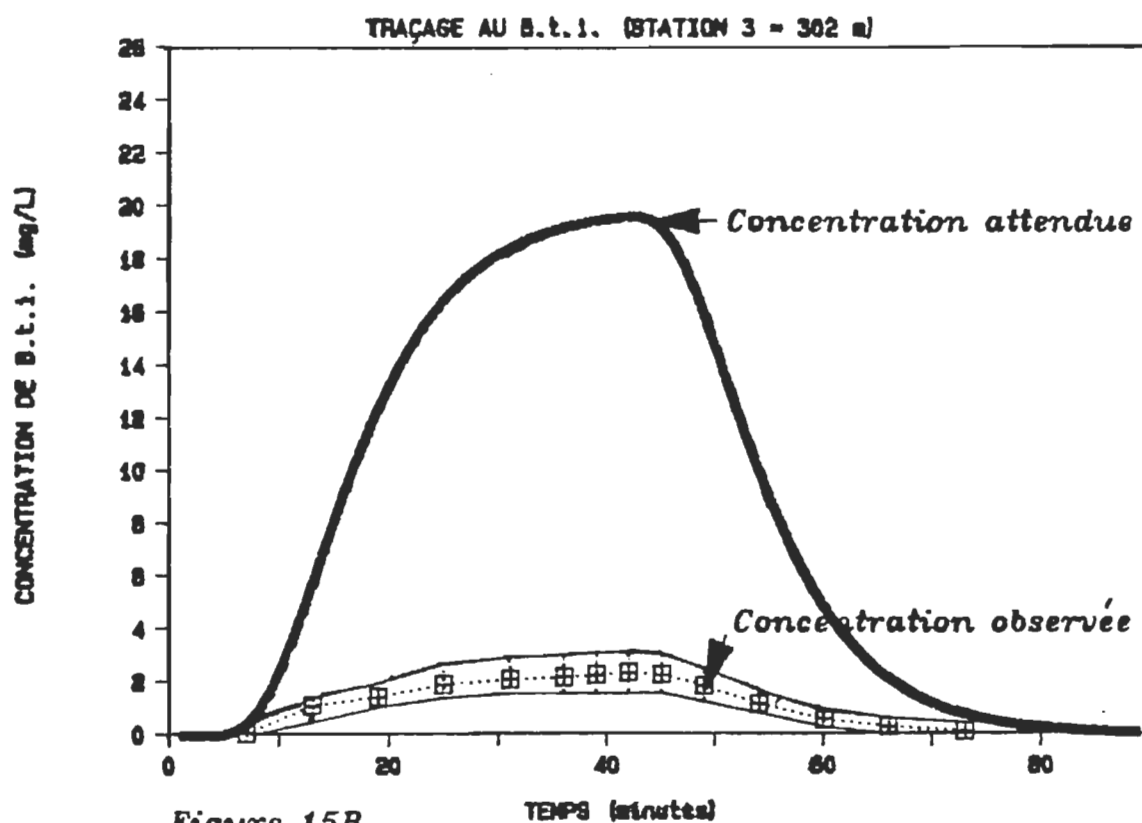
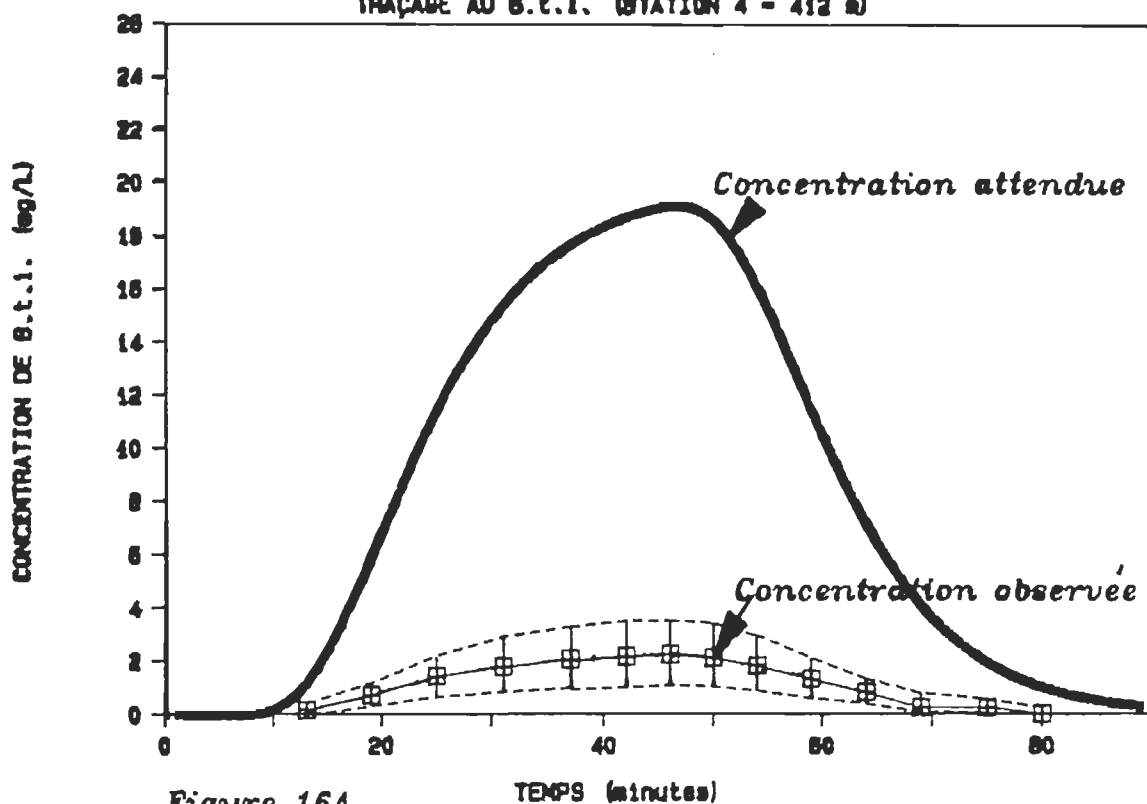


Figure 15B.

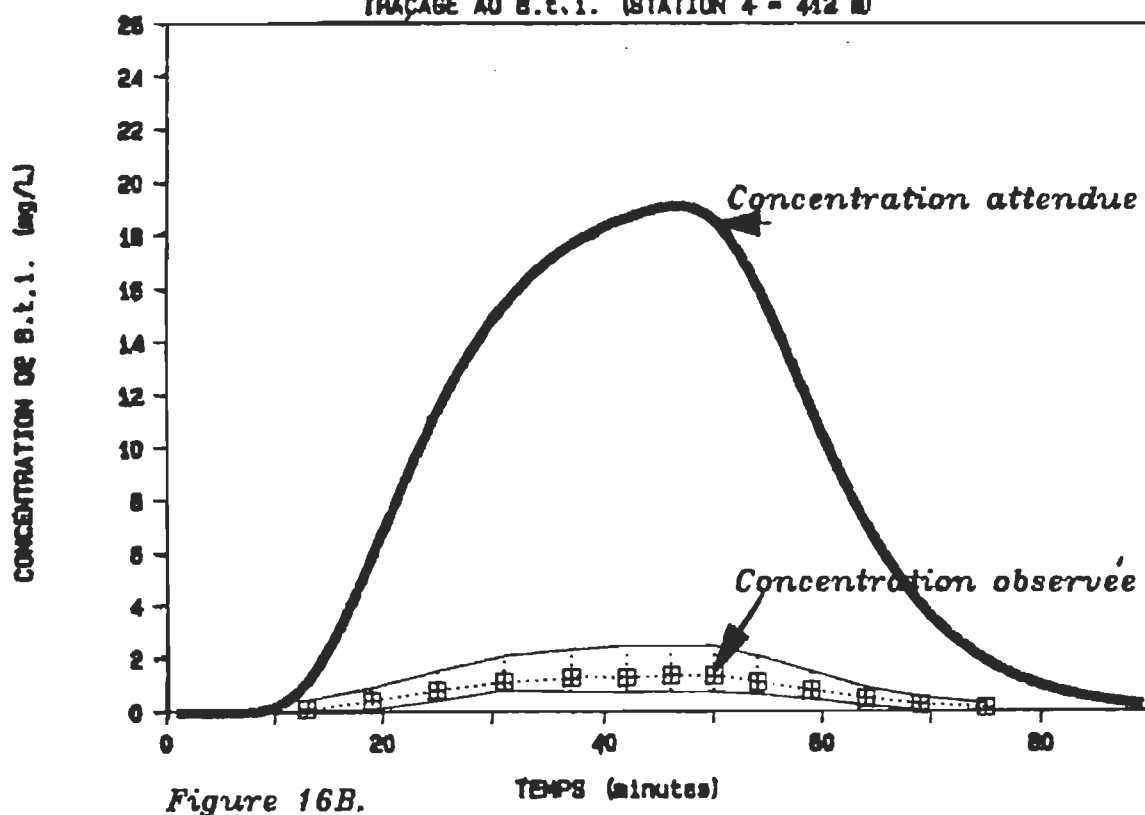
RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (TEMPOIN)

TRAÇAGE AU B.t.l. (STATION 4 - 412 m)



RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (RETENTAT)

TRAÇAGE AU B.t.l. (STATION 4 - 412 m)



RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (TEMOIN)

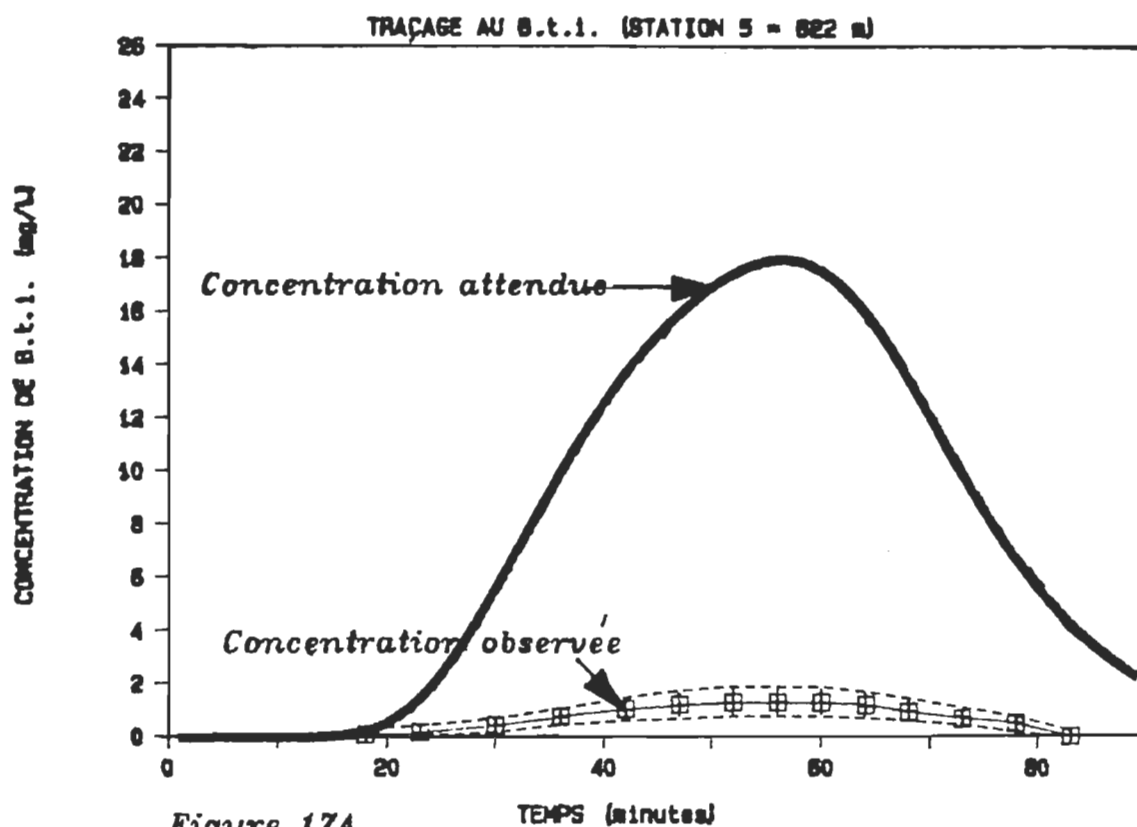


Figure 17A.

RUISSEAU DU PETIT LAC FRASER (RETENTAT)

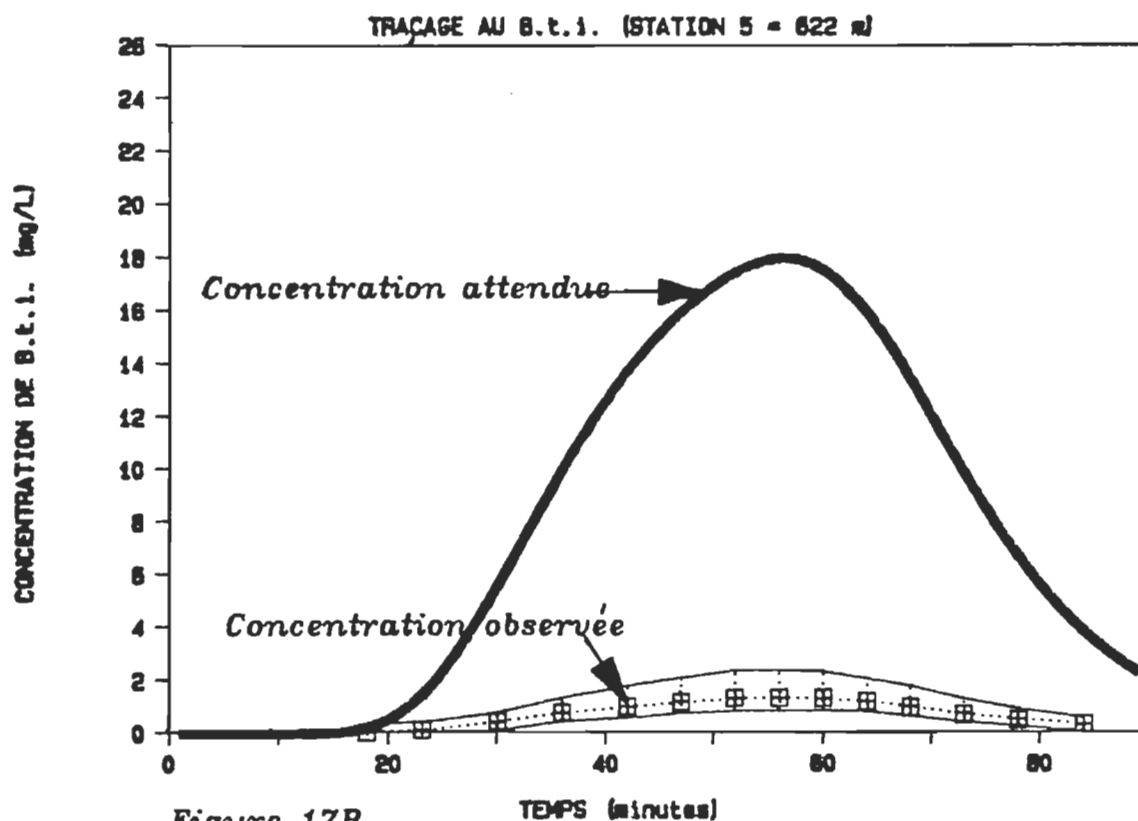


Figure 17B.

Tableau 15
Détermination de la dose de B.t.i.
(rivière aux BETES PUANTES)

Distance (m)	Témoin (mg.s.L ⁻¹)	Retentat (mg.s.L ⁻¹)
0 m	6281,48	6281,48
300 m	4000,79	3835,29
520 m	2154,62	1830,88
800 m	1896,06	1649,18
1200 m	-----	841,45

----- valeur non déterminée

Tableau 16
Détermination de la dose de B.t.i.
(ruisseau du petit lac FRASER)

Distance (m)	Témoïn (mg.s.L ⁻¹)	Retentat (mg.s.L ⁻¹)
0 m	44 788,73	44 788,73
131 m	44 788,73	24 468,77
228 m	18 016,66	13 660,60
302 m	8 532,52	5 124,67
412 m	8 051,81	3 147,25
622 m	1 331,96	3 263,38

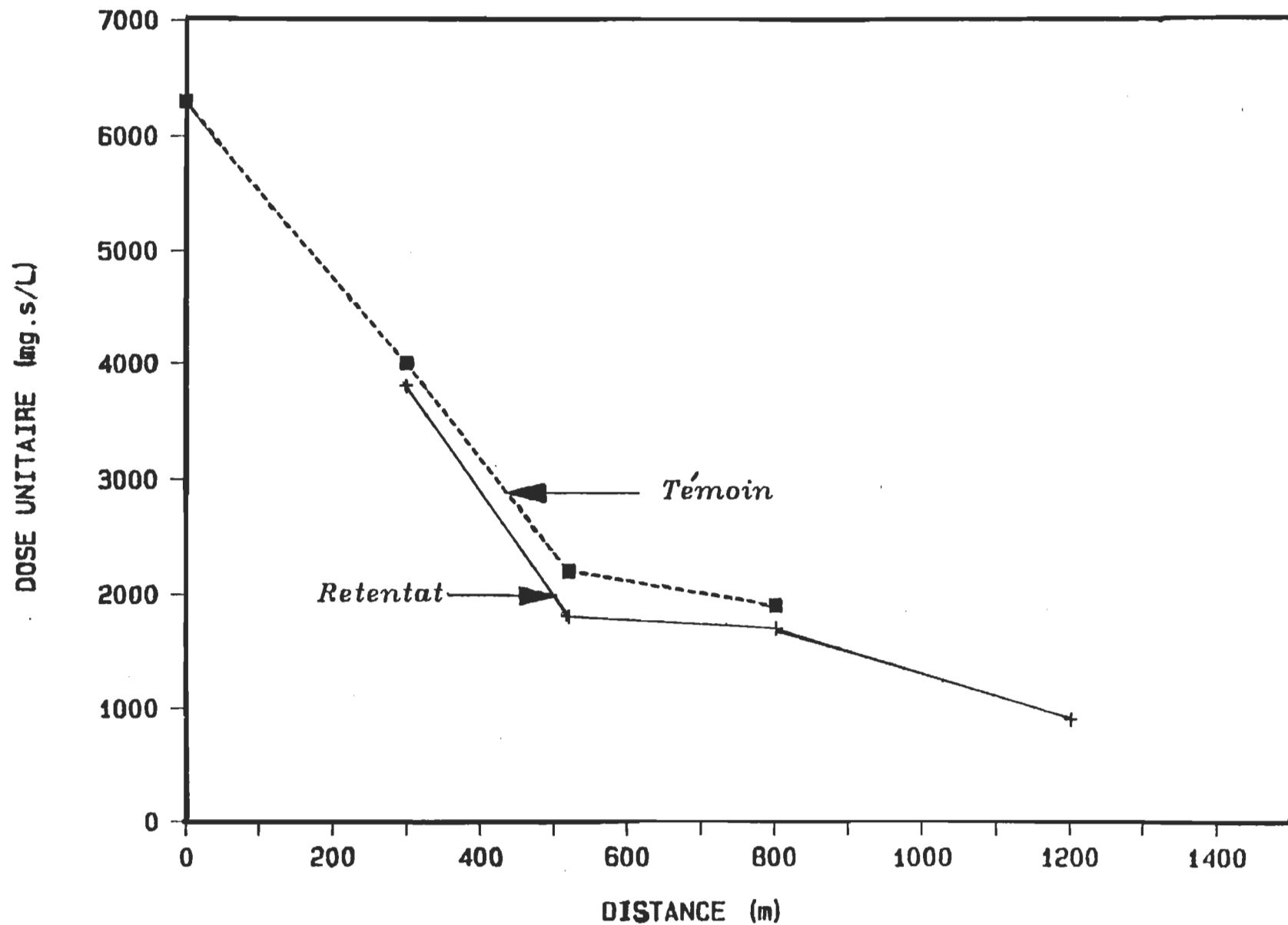


Figure 18. Représentation graphique de la dose de B.t.i. en fonction de la distance (rivière aux BETES PUANTES).

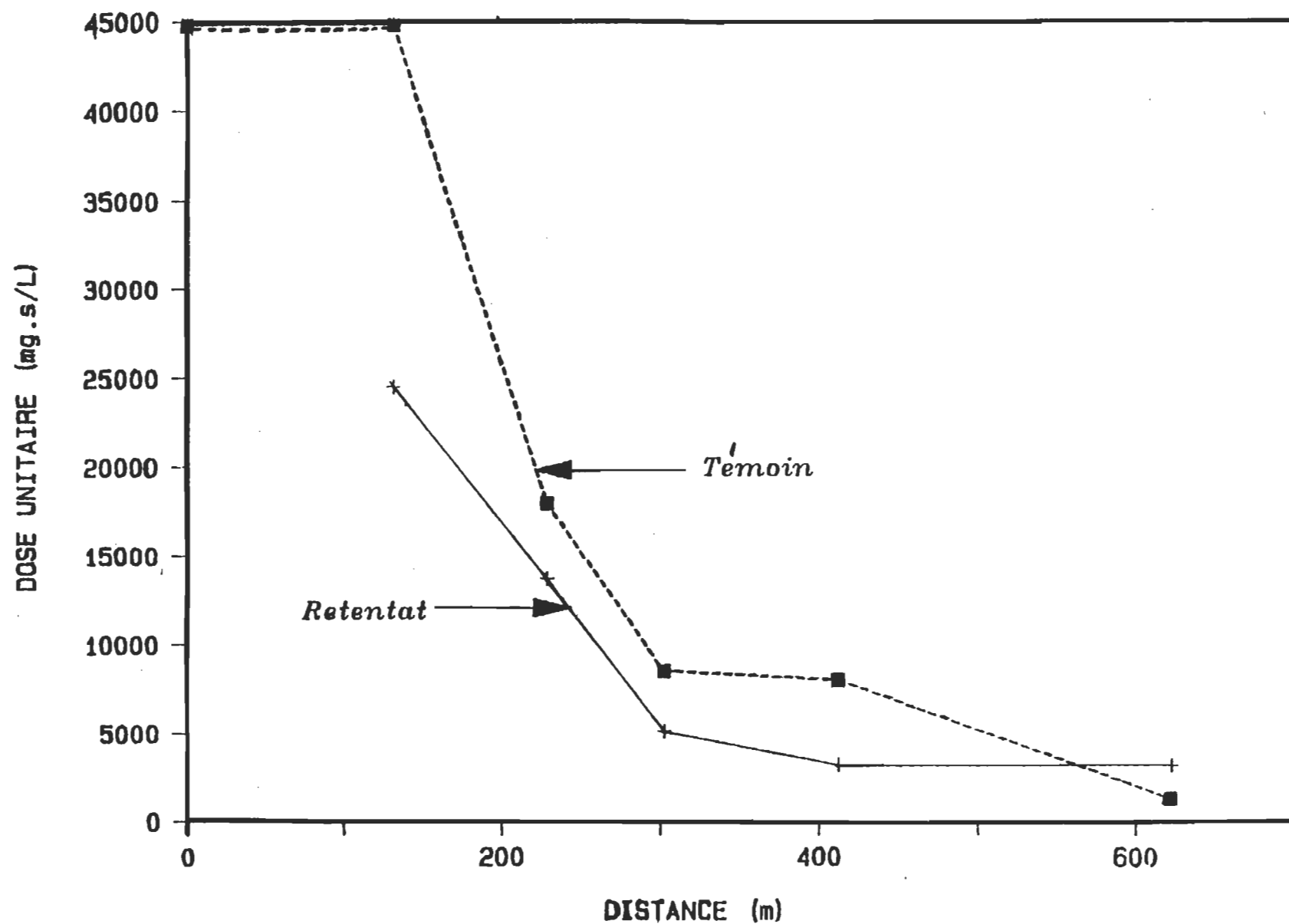


Figure 19. Représentation graphique de la dose de B.t.i. en fonction de la distance (ruisseau du petit lac FRASER).

(65% d'après les témoins et 47 % d'après les retentats).

En dernier, nous avons calculé les longueurs de perte i.e. longueur a laquelle il reste 37% de la concentration initiale de l'activité de l'insecticide (tableaux 17 et 18) en suivant l'exemple de la section II.2.5. On note que ces valeurs obtenues avec le témoin et le retentat varient très peu entre-elles.

Dans la rivière aux BETES PUANTES, la valeur de la longueur de perte est petite sur les sections rapprochées du point d'épandage (de l'ordre de 320 m entre les stations 1 et 2), puis elle augmente rapidement sur les distances plus éloignées (de l'ordre de 2400 m entre les stations 2 et 3).

Dans le ruisseau du petit lac FRASER, on observe le même processus que dans la rivière aux BETES PUANTES. En effet, la longueur de perte (de l'ordre de 120 m entre les stations 1 et 2) double presque sa valeur sur des sections éloignées du point d'épandage (de l'ordre de 227 m entre les stations 3 et 4).

A partir de ces valeurs calculées (i.e. longueurs de perte), nous avons déterminé la longueur de perte moyenne de chaque cours d'eau. Dans la rivière aux BETES PUANTES la longueur de perte moyenne est de 802 m, tandis qu'elle est de 210 m dans le ruisseau du petit lac FRASER.

Tableau 17
Détermination de la longueur de perte de B.t.i.
(rivière aux BETES PUANTES)

STATION	1	2	3	4
Conc. att. (mg.L ⁻¹)	1,828	2,724	2,514	2,544
Conc. obs. (mg.L ⁻¹)				
T	1,148	0,925	0,745	(*)
R	1,104	0,787	0,656	0,340
X_R (Km)	0 → 1	0 → 2	0 → 3	0 → 4
T	0,645	0,482	0,658	ND
R	0,595	0,419	0,596	0,596
X_R (Km)		1 → 2	1 → 3	1 → 4
T		0,358	0,666	ND
R		0,298	0,596	0,597
X_R (Km)			2 → 3	2 → 4
T			2,056	ND
R			2,750	0,882
X_R (Km)				3 → 4
T				ND
R				0,598

T = témoin

R = retentat

X_R = longueur de perte

ND = longueur de perte non déterminée

(*) concentration sublétales impossible à déterminer après analyse probit.

Longueur de perte moyenne sur la section étudiée est de
0.802 Km

Tableau 18

Détermination de la longueur de perte de B.t.i.
(ruisseau du petit lac FRASER)

STATION		1	2	3	4	5
Conc. att. (mg.L ⁻¹)		19,707	19,592	19,227	19,074	17,537
Conc. obs. (mg.L ⁻¹)						
	T	22,222	7,721	3,623	2,213	1,277
	R	10,676	5,944	2,194	1,342	1,289
X_R (Km)		0 → 1	0 → 2	0 → 3	0 → 4	0 → 5
	T	-1,091(*)	0,245	0,181	0,191	0,237
	R	0,214	0,191	0,139	0,155	0,238
X_R (Km)			1 → 2	1 → 3	1 → 4	1 → 5
	T		0,092	0,096	0,124	0,179
	R		0,167	0,110	0,138	0,246
X_R (Km)				2 → 3	2 → 4	2 → 5
	T			0,100	0,151	0,233
	R			0,076	0,126	0,278
X_R (Km)					3 → 4	3 → 5
	T				0,227	0,337
	R				0,228	0,728
X_R (Km)						4 → 5
	T					0,451
	R					-4,803(*)

T = témoin

R = retentat

 X_R = longueur de perte

(*) valeurs non utilisées pour calculer la longueur de
perte moyenne

Longueur de perte moyenne sur la section étudiée est de
0,21 Km.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Cette série d'expérimentation a été faite afin de mettre au point une méthode simple et fiable pour le dosage des cristaux de B.t.i. en concentration sublétales dans des échantillons de terrain. Ceci s'intègre à un programme de recherche plus large dont l'objectif est de modéliser le transport de cet insecticide en rivière.

IV.1 Analyse de la méthode des tests biologiques

Nous avons utilisé la méthode des tests biologiques développés avec les larves de quatrième stade d'Aedes triseriatus pour que nos expériences soient facilement reproductibles. Cette méthode est la plus fréquemment utilisée pour mesurer la toxicité des insecticides biologiques ou chimiques.

Dans le groupe de tests que nous avons effectué, trois répliques ont été nécessaires pour valider statistiquement les concentrations létales 50% (CL_{50}) des suspensions testées. Pour l'expression de nos résultats, nous n'avons rejeté

aucune réplique car les valeurs des khi-carrés étaient non significatives. L'estimation précise de la CL_{50} est probablement due à l'homogénéité de la population larvaire que nous avons utilisée pour réaliser nos tests biologiques.

Récemment, Ibarra et Federici (1987) ont proposé une nouvelle méthode dans laquelle ils utilisent des larves néonates. Une comparaison avec nos résultats est présentée au tableau 19.

On remarquera qu'Ibarra et Federici utilisent des poudres primaires des variétés morrisoni et israelensis, qui ont une plus grande activité toxique que le Teknar^R HPD. Pour les essais biologiques, ils ont choisi des larves d'Aedes aegypti.

Dans une première analyse, la comparaison entre nos résultats et les données d'Ibarra obtenues avec les larves néonates montre que:

1- nous avons utilisé trois répliques (Teknar^R) pour avoir un coefficient de variation inférieur à 20%, tandis que quatre (PG-14) et six répliques (IPS-82) étaient nécessaires, lorsqu'Ibarra utilisait des larves néonates;

2- Les valeurs du rapport Max/Min, de la pente et du Khi-carré (1,13; 2,79; 3,40) sont presque équivalentes à celles de PG-14 (1,46; 3,40; 3,04) et de IPS-82 (1,66; 2,57;

3,06), ce qui permet de dire que nos tests réalisés avec les larves de quatrième stade sont aussi performants que ceux développée avec les larves néonates. Cependant, la méthode développée avec les larves néonates offre l'avantage d'être plus rapide et occupe moins d'espace.

Dans un deuxième temps, si nous analysons seulement les résultats d'Ibarra (tableau 19), nous constatons que pour l'obtention d'un coefficient de variation inférieur à 20%, la méthode développée avec les larves néonates exige peu de répliques (quatre pour PG-14 et six pour IPS-82), par rapport aux tests biologiques avec larves de quatrième stade qui nécessite neuf répliques (PG-14). De plus, les larves néonates sont physiologiquement plus uniformes, sont environ dix fois plus sensibles et semblent offrir une meilleure précision qu'avec les larves de quatrième stade. Cependant, les auteurs ne recommandent pas que la méthode avec les larves néonates remplace celle développée avec les larves de quatrième stade, mais ils ne précisent pas la raison. Ces auteurs suggèrent fortement que d'autres tests soient réalisés afin de déterminer son utilité pour cet usage.

IV.2 Evaluation de la méthode d'ultrafiltration

Le procédé d'ultrafiltration tangentielle est un système versatile, d'utilisation facile et rapide qui permet de

Tableau 19

Comparaison des tests biologiques avec les données d'Ibarra
et Federici (1987)

Auteurs	Ibarra	Ibarra	Ibarra	Présent travail
Méthode	T.B.L.N.	T.B.L.4	T.B.L.N.	T.B.L.4
Variété B.t.	<u>morrisoni</u> (PG-14)	<u>morrisoni</u> (PG-14)	<u>israelensis</u> (IPS-82)	<u>israelensis</u> (Teknar HPD)
N	4	9	6	3
CL ₅₀ (1)	4,12	41,25	5,21	600(2)
Max/Min	1,46	1,47	1,66	1,13
Pente	3,40	5,77	2,57	2,79
Khi-carré	3,04	1,34	3,06	3,40

N = nombre de répliques nécessaires pour avoir un coefficient de variation inférieur à 20%.

T.B.L.N. = tests biologiques réalisés avec des larves néonates.

T.B.L.4 = tests biologiques réalisés avec des larves de quatrième stade.

(1) = concentration létale 50%, exprimée en ng.mL⁻¹.

(2) = 600 ng.mL⁻¹ est équivalent à 0,6 mg.L⁻¹

N.B. voir tableau 9 pour explication des autres abréviations.

concentrer en moyenne 20 L en 60 minutes. Ceci permet dans notre cas, de traiter par jour, environ dix échantillons contenant en moyenne 4 à 5 mg.L^{-1} de matière en suspension. L'excellent pouvoir de récupération de l'appareil d'ultrafiltration tangentielle se compare bien avec d'autres méthodes de concentration plus coûteuses et plus laborieuses.

Bien que nous ayons de bons résultats avec l'appareil d'ultrafiltration, nous remarquons (tableaux 11 et 12) que nous avons un meilleur pourcentage de récupération avec les échantillons de la rivière aux BETES PUANTES (moyenne de 90%) par rapport à ceux du ruisseau du petit lac FRASER (moyenne de 70%).

On pourrait se demander d'une part, s'il n'existe pas une corrélation entre le pourcentage de récupération et la concentration de l'échantillon ou la provenance de l'eau et d'autre part, si une modification des cristaux ne se produit pas au cours du processus d'ultrafiltration.

D'après les résultats du tableau 4, une variation de la concentration n'affecte pas le pouvoir de récupération. La même remarque peut-être faite en observant les tableaux 11 et 12. En effet, dans la rivière aux BETES PUANTES, les concentrations de B.t.i. (avant ultrafiltration) aux différentes stations sont moins élevées que dans le ruisseau

du petit lac FRASER. Cependant, nous enregistrons un meilleur pourcentage de récupération avec les échantillons de la rivière aux BETES PUANTES, ce qui indique que la concentration n'affecte pas le pouvoir de récupération. La différence proviendrait-elle de la qualité de l'eau?

Il est douteux que la qualité de l'eau affecte le pourcentage de récupération si on observe le tableau 4. En effet, les résultats obtenus avec l'eau déminéralisée (86%) et avec l'eau du BOITEL (83%) sont presque identiques. De plus, l'eau de la rivière aux BETES PUANTES est très apparentée à celle du BOITEL. Finalement, le tableau 4 indique que le pourcentage de récupération varie entre 78% et 88% et que les standards du ruisseau du petit lac FRASER (tableau 11) et de la rivière aux BETES PUANTES (tableau 12) sont respectivement de 77% et 90%.

L'autre éventualité que nous avons envisagée pour expliquer la différence du pourcentage de récupération entre les deux cours d'eau est la modification de la structure des cristaux lors de l'ultrafiltration. Ces variations ne peuvent être attribuées à un passage de cristaux brisés au travers des filtres, car le filtrat testé régulièrement n'a jamais été toxique, même pour des pertes de l'ordre de 50% (station 1 du ruisseau du petit lac FRASER), à moins que les particules soient trop petites pour être ingérées par les larves de moustiques.

Les cristaux auraient pu s'agglomérer ou s'adsorber sur les particules présentes et former des agrégats qui n'ont pu être ingérés par les larves de moustiques, ce qui aurait provoqué une baisse du pourcentage de récupération. On pourrait aussi se demander si la qualité des particules récupérées du ruisseau du petit lac FRASER est suffisamment différente de celle de la rivière aux BETES PUANTES pour causer des aggrégations ou faire varier l'adsorption sur les filtres pour permettre d'expliquer les différences dans les pourcentages de récupération. Même si, les différences observées avec les échantillons du ruisseau du petit lac FRASER sont plus fortes qu'avec ceux de la rivière aux BETES PUANTES, aucun critère acceptable ne permet la différenciation nette à ce stade de l'étude. Il serait souhaitable lors d'études ultérieures, d'envisager des tests qui tiendront compte de la qualité de l'eau. Il s'agira de préparer des échantillons (de l'ordre de 20 L) qu'on soumettra à l'ultrafiltration. Ces échantillons contiendront des algues et/ou certaines matières (dont on fera varier la quantité) susceptibles de se retrouver dans les eaux naturelles. Les résultats obtenus après ces tests permettront de déterminer l'influence de ce paramètre sur le pourcentage de récupération.

L'excellent pouvoir de récupération de l'appareil d'ultrafiltration tangentielle a permis de doser les échantillons à concentration sublétales. En effet, il a été possible de déterminer la concentration de l'échantillon de la station 4 (rivière aux BETES PUANTES) qui au départ était à concentration sublétales pour les larves de moustiques (tableau 11). En dosant le retentat et en rapportant cette concentration sur le volume de l'échantillon filtré, nous avons déterminé la concentration ($0,34 \text{ mg.L}^{-1}$) de cet échantillon. Cette détermination de la concentration serait impossible par analyse probit dans les conditions normales car la CL_{50} du standard est de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, ce qui constitue la limite du seuil de détection.

Au cours de nos expériences, nous avons concentré les échantillons au moins 20 fois en terme de volume. De cette façon, nous abaissons le seuil de détection de la toxicité de B.t.i. en milieu naturel. Par exemple si la CL_{50} du témoin était de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, le seuil de détection du retentat devrait être de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ (20 fois moins) si on avait une récupération de 100%. Cependant en admettant que le pourcentage de récupération est de 70%, on ramène cette valeur à $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, ce qui représente une diminution du seuil de concentration d'environ 12 fois. Dans des conditions opérationnelles, il sera possible de déterminer précisément des concentrations de l'ordre de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Si nous combinons

l'ultrafiltration tangentielle et la méthode des tests biologiques développée avec les larves néonates (10 fois plus sensibles) le seuil pourrait être encore plus bas. Ceci permettrait de mesurer des concentrations de l'ordre de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ (10 ng.mL^{-1}). De ce fait, la combinaison des deux techniques rend les études de distribution, dispersion et persistance beaucoup plus valables.

Cependant, il faudra vérifier si les larves néonates réagiront différemment vis à vis un échantillon concentré 20 fois. En effet, en concentrant les particules, elles pourraient former des agrégats de grosses tailles, ce qui pourrait entraîner une ingestion moindre de la toxine et donc une mortalité plus faible des larves néonates. Dans ces conditions, le pourcentage de récupération en serait affecté et le seuil de détection de toxicité du B.t.i. augmentera.

La méthode d'ultrafiltration tangentielle offre donc la possibilité de mesurer des concentrations dans des conditions dites réelles ou opérationnelles, ce qui évite les surdosages comme dans notre cas. Elle permettra aussi l'étude plus réaliste de l'activité résiduelle de B.t.i. en milieu naturel, car dans les études antérieures il était difficile de suivre la toxicité de B.t.i. parce que l'on fonctionnait avec des doses opérationnelles. Dans ces conditions, suite à une perte de 50%, les résultats subséquents étaient impossible à calculer avec précision. Grâce à

l'ultrafiltration on peut mesurer des concentrations inférieures au seuil de détection normal, soit la CL_{50} . Par exemple, pour un échantillon qui au départ avait une concentration de 5 mg.L^{-1} , une perte de 99% (reste $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) de son activité toxique serait impossible à quantifier (en assumant une CL_{50} de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$). Après l'ultrafiltration, avec un pourcentage de récupération minimal de 70%, on pourra mesurer la concentration du réténat ($0,70 \text{ mg.L}^{-1}$), et , connaissant le pourcentage de récupération, celui de l'échantillon original.

IV.3 Déplacement de l'activité toxique de l'insecticide en eau courante

On a pu noter (figures 18 et 19), une perte de la dose de Teknar^R lorsqu'on s'éloigne du point d'épandage. Cette perte est plus forte dans les 500 premiers mètres (66% pour la rivière aux BETES PUANTES) et dans les 300 premiers mètres (80% pour le ruisseau du petit lac FRASER), en aval du point d'épandage. A partir de 500 m (rivière aux BETES PUANTES) et 300 m (ruisseau du petit lac FRASER), la perte est faible et la dose est presque stable sur de longues distances. Ces observations ne peuvent se comparer aux études antérieures (Frommer et al., 1980; Frommer et al., 1981a; Frommer et al., 1981b), car ces chercheurs utilisaient le compte des spores

pour suivre le comportement de B.t.i. en eau courante et non pour expliquer sa toxicité.

Les variations de la dose que nous observons sur les figures 11 et 12 ne sont pas attribuables à une modification ou à une dégradation de la toxine, car Guillet et al. (1980), Guillet et al. (1982), Dupont et Boisvert (1986) ont montré que la toxine était stable pendant plusieurs jours en eaux naturelles. De ce fait, d'autres phénomènes devraient être envisagés pour expliquer la perte de B.t.i. en eau courante.

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la perte de B.t.i. dans un cours d'eau:

A- l'ingestion des particules de B.t.i. en suspension par les larves de simuliés;

B- l'adsorption des particules sur des substrats naturels présents (algues, végétation, périphyton);

C- perte par sédimentation.

Les particules de B.t.i. en suspension sont ingérées par les larves de mouches noires qui vivent fixées sur des supports (Guillet et al., 1985a). Les grosses particules sont interceptées par les mailles prémandibulaires. Régulièrement, ces mailles sont repliées pour permettre l'ingestion des particules (Elsen, 1979; Guillet et al., 1985a). Les larves peuvent également ingérer de très fines

particules par filtration passive (Wotton, 1976; Ross et Craig, 1980). On a pu noter que le rendement du processus (nombre de particules passées/nombre de particules ingérées) diminue lorsque la quantité de matière en suspension augmente (Kurtak, 1978). Il s'établit alors une compétition entre les particules naturelles et les particules de B.t.i. dont le nombre est constant. Cette compétition explique la baisse de l'efficacité des grosses particules lorsque la turbidité augmente Guillet et al. (1985a). Or dans les cours d'eau étudiés, il y avait peu de matière en suspension, ce qui diminuait la compétition entre les particules naturelles et les particules de B.t.i.. Dans ces conditions, les particules de grosses tailles , constituant les grosseurs préférentielles d'ingestion pour les larves de simules (Guillet et Escaffre, 1979), seront ingérées beaucoup plus rapidement. Ceci expliquerait l'importante perte de la dose dans les 500 premiers mètres (rivière aux BETES PUANTES) et dans les 300 premiers mètres (ruisseau du petit lac FRASER), tandis que les petites particules restées en suspension se déplaceront beaucoup plus loin en aval. Cette hypothèse pourrait être vérifiée avec des tests en dalles par analyse de la grosseur des particules par ultrafiltration lors d'une étude ultérieure. Il s'agira d'ultrafiltrer sur des filtres de différentes porosités, des échantillons qui auraient circulé dans des dalles, contenant une quantité fixe de larves de mouches noires. Après des tests biologiques

réalisés avec les filtrats obtenus, on pourra déterminer la taille préférentielle des particules de B.t.i. ingérées par les larves de simuliés.

Récemment, Morin et al. (1988) ont démontré que les larves de mouches noires présentes dans le ruisseau du petit lac FRASER pouvaient ingérer jusqu'à 50% du seston sur une distance de 40 m à partir du début du ruisseau. On peut considérer que le B.t.i. en suspension fait partir du seston naturel que les larves vont ingérer. De plus, il est à noter que la densité de larves la plus forte, se retrouve près des décharges de lac comme dans le cas du ruisseau du petit lac FRASER.

La toxine de B.t.i. est insoluble dans l'eau (donc particulaire). Ces particules peuvent adhérer aux substrats solides présents dans le cours d'eau. Back et al. (1985) ont suggéré qu'après un traitement au Teknar^R, l'impact sur les Bléphariceridae serait dû au B.t.i ayant sédimenté sur le lit du ruisseau ou ayant adhéré au périphyton. De plus, Dupont et Boisvert (1986) ont démontré que la toxine de B.t.i. s'adsorbait sur des fractions solides de végétations et de sédiments. Donc, l'adsorption sur des substrats contribue à la perte de B.t.i., et réduit la portée en aval de l'insecticide.

Le phénomène de sédimentation peut être considéré comme un facteur quantitatif peu important dans la perte de la dose de B.t.i. à cause de la vitesse de déplacement de l'eau ($0,46 \text{ m.s}^{-1}$ pour la rivière aux BETES PUANTES et $0,20 \text{ m.s}^{-1}$ pour le ruisseau du petit lac FRASER). A ces vitesses, mêmes les algues et les débris végétaux qui sont de grosseurs supérieures aux particules de B.t.i. restent en suspension.

Si nous observons la perte de la dose dans les deux rivières (tableaux 13 et 14), nous constatons que la perte est beaucoup plus importante dans le ruisseau du petit lac FRASER que dans la rivière aux BETES PUANTES. Ceci indique qu'en situation réelle, la portée efficace est plus importante dans les grands cours d'eau. Cette différence serait due d'une part, à la plus grande interaction des particules de B.t.i. avec les fractions solides (Undeen et al., 1984; Umino et al., 1984) et d'autre part, à la présence d'une plus importante quantité de larves par unité de débit (Undeen et al., 1980; Morin et al., 1987) dans les petits cours d'eau. Ceci aura pour conséquence une perte beaucoup plus rapide dans le ruisseau du petit lac FRASER.

En conclusion, cette expérimentation a permis de montrer d'une part, l'utilité de l'appareil d'ultrafiltration tangentielle dans l'étude du transport de B.t.i. en rivière. L'excellent pouvoir de récupération de l'appareil permet d'avoir peu de différence entre le témoin et le retentat.

Dans ces conditions, nous pourrions utiliser seulement les retentats des échantillons pour étudier le transport de l'insecticide, ce qui nous permettra de contourner le problème posé par les concentrations sublétales.

De plus, cette étude a permis de mettre en évidence certains facteurs (ingestion et adsorption des particules de B.t.i.) pouvant causer la perte de l'insecticide. L'ingestion est liée à la présence de larves de mouches noires dans le cours d'eau, tandis que l'adsorption des particules de B.t.i. sur les fractions solides de végétation ou de sédiments occasionne une perte graduelle de l'insecticide. De plus, ces deux phénomènes sont potentiellement plus importants dans les petits cours d'eau. Il serait intéressant de quantifier ces phénomènes par des tests en dalles lors d'expériences ultérieures. Pour l'ingestion, il s'agira de doser l'échantillon recueilli après passage le long des dalles, contenant des quantités variables de larves de mouches noires. Pour l'adsorption, les larves de mouches noires seront remplacées par des substrats naturels (algues, végétation, sédiments, cailloux).

L'analyse de la perte dans les différents cours d'eau a permis d'estimer un nouveau paramètre de transport (longueur de perte). En l'associant au débit du cours d'eau et à la dispersion de l'insecticide, on pourra modéliser le transport de l'insecticide en rivière ce qui permettra d'optimiser les épandages.

BIBLIOGRAPHIE

- Amstrong, J.L., Rohrmann, G.E. and Beaudreau, G.S. Delta endotoxin of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. J. Bacteriol., 1985, 161, 39-46.
- Angus, T.A. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature, 1954, 173, 545-546.
- Angus, T.A. Implication of some recent studies of Bacillus thuringiensis. A personnal review Proc. 4th Int. Colloq. Insect Pathol. College Park, Md, USA, 1970, 183-189.
- Aoki, K. and Chigasaki, T. Veber atoxogene Sotto-Bacillen. Bull. Impr. Sericet. Expt. Sta. Japan, 1916, 1, p. 141.
- Aris, R. On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube. Proc. R. Soc. Ser., 1956, 235, 67-77.
- Back, C., Boisvert, J., Lacoursière, J.O. and Charpentier, G. High dosage treatment of a Quebec stream with Bacillus thuringiensis serovar. israelensis: effficacy against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non-target insects. Can. Ent., 1985, 117, 1523-1534.
- de Barjac, H., et Bonnefoi, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de Bacillus du type Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 1962, 7, 5-31.

- de Barjac, H., et Bonnefoi, A. Classification des souches de Bacillus thuringiensis. C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 264D, 1811-1813.
- de Barjac, H., and Bonnefoi, A. Classification of Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 1973, 18, 5-17.
- de Barjac, H. et Bonnefoi, A. Mise au point sur la classification des Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 1973, 18, 424-431.
- de Barjac, H., Cosmao-Dumanoir, V., SHAIK, R., et Viviani, G. Bacillus thuringiensis var. paskistani: nouvelle sous-espèce correspondant au sérotype 13. C.R. Acad. Sci. Paris, 1977, 284D. 2051-2058.
- de Barjac, H. Toxicité de Bacillus thuringiensis var. israelensis pour les larves d'Aedes aegypti et d'Anopheles stephensi. Ibid., 1978a, 286, 1175- 1178.
- de Barjac, H. Un nouveau candidat à la lutte biologique contre les moustiques: Bacillus thuringiensis serovar. israelensis. Entomophaga, 1978b, 23, 309-319.
- de Barjac, H. Etude cytologique de l'action de Bacillus thuringiensis sur les larves de moustiques. C.R. Acad. Sc., Paris, 1978c, 286, 1629-1632.
- de Barjac, H., and Larget, I. Proposals for the adoption of a standardized bioassay method for the evaluation of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of Bacillus thuringiensis. W.H.O. document, 1979, VBC 79 774 p. 16.

- de Barjac, H., and Coz, J. Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à Bacillus thuringiensis var. israelensis. Bull. O.M.S., 1979, 57, 139-141.
- de Barjac, H. Identification des sérotypes H des Bacillus thuringiensis. In H.W. Burgess (Ed). Microbial control of pest and pest diseases. Academic Press, Paris, 1981, pp. 35-43.
- Berliner, E. Veber die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe. Z.f. Gesam. Getreidew., 1911, 63-70.
- Bonnefoi, A., et de Barjac, H. Classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis par la détermination de l'antigène flagellaire. Entomophaga, 1963, 8, 223-229.
- Carleton, B.C. and Gonzalez, J.M. Jr. The genetics and molecular biology of Bacillus thuringiensis. In "Molecular biology of the Bacilli", vol II, D.A. Dubeau (Ed.), Acad. Press, 1985, pp. 211-249.
- Carpenter, S., and Lacasse, W.J. Mosquitoes of North America. University of California Press. Berkely and Los Angeles, 1955, p. 360 .
- Chalifour, A., Back, C. et Boisvert, J. Rapport annuel présenté à l'Organisation Mondiale de la Santé , 1985, pp. 150.
- Cheung, J.Y.K. and Hammock, B.D. Separation of the three biologically distinct activities from parasporal crystal of Bacillus

- thuringiensis var. israelensis. Current Microbiol., 1985, 12, 125-126.
- Colbo, M.H., and Thompson, B.H. An efficient technique for laboratory rearing of Simulium verecundum. S. and J. (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool., 1978, 56, 507-510.
- Colbo, M.H., Undeen, A.H. Effect of Bacillus thuringiensis var. israelensis against black fly larvae in stream trial for control of Simuliidae. Mosq. News, 1980, 40, 181-184.
- Colbo, M.H., and Undeen, A.H. Effect of Bacillus thuringiensis on non target insects in stream trials for control of Simuliidae. Mosq. News, 1980, 40, 368-371.
- Colbo, M.H., and O'Brien, H. A pilot black fly (Diptera: Simuliidae) control program using Bacillus thuringiensis var. israelensis in Newfoundland. Can. Ent., 1984, 116, 1085-1096.
- Cooksey, K.E. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: biochemistry and mode of action. In H.W. Burgess and H.D. Hussey (Ed) Microbiol. control of insect and mites. Academic Press Inc, New-York, 1971, pp. 247-274.
- Couch, T.L., and Ross, D.A. Production and utilisation of Bacillus thuringiensis. Biotechnol. Bioeng., 1980, 22, 1297-1304.
- Dadd, R.H. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzyme. J.Insect Physiol., 1975, 21, 1847-1853.

- Daum, R.J., and Killcreas, W. Two computer programs for probit analysis. Bull. Entomol. Soc. Amer., 1966, 12, 365-369.
- Daum, R.J. A revision of two computer programs for probit analysis. Bull. Entomol. Soc. Amer., 1972, 16, 10-15.
- Davidson, E.W., Singer, S.S. and Briggs, J.D. Pathogenesis of Bacillus thuringiensis strains ss II-1. Infection in Culex pipiens quinquefasciatus (c. pipiens fatigans) larvae. J. Invert. Pathol., 1975, 25, 179-184.
- Dejoux, C. Recherches préliminaires concernant l'action de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. Bull. O.M.S., 1979, VBC/79.721, p. 11.
- Delaporte, B., and Beguin, S. Etude d'une souche de Bacillus pathogène pour certains insectes identifiable à Bacillus thuringiensis Berliner. Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 632-642.
- Dukta, B.J. and Kwan, K.K. Bacterial die-off and stream transport studies. Water Resources, 1980, 14, 909-915.
- Dupont, C. and Boisvert, J. Persistence of Bacillus thuringiensis serovar. israelensis toxic activity in the environment and interaction with natural substrates. Water Air Soil Pollution, 1986, 29, 425-438.

- Dulmage, A.T. Insecticidal activity of isolates of Bacillus thuringiensis and their potential for pest control. In H.D. Burgess (Ed) Microbiol. control of pests and plant diseases. Academic Press, 1981, pp. 193-222.
- Ellar, D.J., Knowles, B.H., Drobniewski, F.A., and Haider, M.Z. The insecticidal specificity and toxicity of Bacillus thuringiensis delta endotoxin may be determined respectively by an initial binding to membrane specific receptor followed by a common mechanism of cytolysis. Invertebr. Pathol., 1986, 17, 7-10.
- Elder, J.W. The dispersion of marked fluid in turbulent shear flow. J. fluid. Mech., 1959, 5, 544-560.
- Elsen, P. La nature et la taille des particules ingérées par les larves du complexe Simulium damnosum dans les rivières de la Côte d'Ivoire. Rev. Zool. Afr., 1979, 93, 476-484.
- Fast, P.G. Bacillus thuringiensis, its story and mode of action. Dev. Ind. Microbiol., 1974, 15, 195-198.
- Finney, D.J. Probit analysis 3rd ed. Cambridge University Press London and New-York, 1971, pp. 333.
- Fisher, H.B. A note on the one dimensional dispersion model. Air, Water, Pollut. Int. J., 1966, 10, 443-452.
- Fisher, H.B. The mechanics of dispersion in natural stream . J. Hydraulics Div., Am. Soc. Civ. Engrs, 1967, 93, 187-216.

- Fisher, H.B. Dispersion predictions in natural streams. J. Sanit. Engng. Div. Am. Soc. Civ. Engrs, 1968, 94, 927-943.
- Frommer, R.L., Nelson, J.H., Remington, M.P. and Gibbs, P.H. The susceptibility of Simulium vittatum larvae (Diptera: simuliidae) to Bacillus thuringiensis var. israelensis in the laboratory. Mosq. News, 1980, 40, 577-584.
- Frommer, R.L., Nelson, J.H., Remington, M.P., and Gibbs, P.H. The influence of extensive aquatic vegetative growth on the larvicidale activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis in reducing Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) larvae in their natural habitat . Mosq. News, 1981, 44, 707-712.
- Frommer, R.L., Hembree, S.C., Nelson, J.H., Remington, M.P., and Gibbs, P.H. The evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis in reducting Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) larvae in their natural habitat with no extensive aquatic vegetative growth. Mosq. News, 1981a, 41, 339-347.
- Frommer, R.L., Hembree, S.C., Nelson, J.H., Remington, M.P., and Gibbs, P.H. The effects of extensive vegetative growth on the distribution of Bacillus thuringiensis var. israelensis in flowing water. Mosq. News, 1981b, 41, 713-724.
- Frommer, R.L., Hembree, S.C., Nelson, J.H., Remington, M.P., and Gibbs, P.H. The distribution of Bacillus thuringiensis var. israelensis

in flowing water with non extensive aquatic vegetative growth.
Mosq. News, 1981c, 41, 331-338.

Garcia, R., and Desrochers, B. Toxicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis to some California mosquitoes under different conditions. Mosq. News, 1979, 39, 541-544.

Gaugler, R, Molloy, D. Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Environ. Entomol., 1980, 9, 704-708.

Gaugler, R. and Finney, J.R. A review of Bacillus thuringiensis var. israelensis (serotype H-14) as a biological control agent of black flies (Diptera: Simuliidae). Msc. Publ. Ent. Soc. Am., 1982, 12, pp. 30.

Golberg, L.J., and Margalit, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti and Culex pipiens. Mosq. News, 1977, 37, 577-584.

Guillet, P., and de Barjac, H. Toxicité de Bacillus thuringiensis var. israelensis pour les larves de similies vectrices de l'Onchocercose. C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat., 1975, 289, 549-552.

Guillet, P. et Escaffre, H. Evaluation de Bacillus thuringiensis pour la lutte contre les larves de Simulium damnosum s.l. II: Efficacité

comparée de trois formulations expérimentales. WHO document, 1979, VBC/79 735, p. 7.

Guillet, P., Dempah, J., and Coz, J. Evaluation de Bacillus thuringiensis sérotype H-14 de Barjac pour la lutte contre les larves de Simulium damnosum s.l. III. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sa stabilité en zone tropicale. W.H.O. document, 1980, VBC/80, 756-759.

Guillet, P., Escaffre, H., Prud'Hom, J.M. L'utilisation d'une formulation à base de Bacillus thuringiensis H-14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. II: Stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical. Cahier O.R.S.T.O.M., ser. Ent. méd. et Parasitol., 1982, 20, 181-185.

Guillet, P., Escaffre, H., Prud'Hom, J.M. et Bakayoko, S. Etudes des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de Bacillus thuringiensis H-14 vis-à-vis des larves du complexe Simulium damnosum (Diptera: Simuliidae) I: Influence de la nature et de la taille des particules. Cahier ORSTOM sér. Ent. Méd. et Parasitol., 1985a, 23, 257-264.

Guillet, P., Escaffre, H., Prud'Hom, J.M. et Bakayoko, S. Etudes des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de Bacillus thuringiensis H-14 vis-à-vis des larves du complexe Simulium damnosum (Diptera: Simuliidae) II: Influence du temps de contact et de la quantité de particules en suspension dans l'eau. Cahier ORSTOM sér. Ent. Méd. et Parasitol., 1985b, 23, 265-271.

- Habib, M.E.M. Potency of Bacillus thuringiensis var. israelensis (H-14) against some aquatic dipterous insects. Z. Angew. Ent., 1983, 95, 368-376.
- Hannay, C.L. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. Nature, 1953, 172, 100-104.
- Heimpel, A.M., and Angus, T.A. The taxonomy of insect pathogens related to Bacillus cereus Frankland et Frankland. Can. J. Microbiol., 1958, 4, 531-541.
- Hewlett, P.S., and Plackett, R.L. The interpretation of Quantal Responses in Biology. University Park Press. Baltimore, 1979, pp. 81.
- Hubert, J.J. Bioassay. 2nd. Ed. Kendall / Hunt Publishing. Dubuque Iowa, 1984, pp. 157.
- Ibarra, E.J., and Federici, A.B. Paraspore bodies of Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni (PG-14) and Bacillus thuringiensis subsp. israelensis are similar in protein composition and toxicity. FEMS Microbiology Letters, 1984, 34, 79-84.
- Ibarra, E.J., and Federici, A.B. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. J. Am. Control Assoc., 1987, 3, 187-192.

- Ignoffo, C.M., Hostetter, D.L., Pinell, R.E., and Garcia, C. Relative susceptibility of six soybean caterpillars to a standard preparation of Bacillus thuringiensis var. kurstaki. J. Econ. Entomol., 70, 60-63.
- Ignoffo, C.M., Garcia, C., Kroha, M.J., Fukuda, T., and Couch, T.L. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis for use against mosquitoes. Mosq. News, 1981, 41, 85-93.
- Insell, J.P. and Fitz-James P.C. Composition and toxicity of the inclusion of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50, 56-62.
- Isakova, N.P. Une nouvelle variété de bactérie de type cereus, pathogène pour les insectes. Dokl. Akad. Sci. Nauk. Selsk., 1958, 23, 26-27.
- Ishiwata, S. (in Japanese) Kyoto Sangyo Ko, Hi jo, Sanji Hokoku 2., 1905, pp. 346.
- Iwabuchi, H. Popular Silkworm Pathology, 1st Ed., Meibundo, Tokyo, pp. 428.
- Jenkins, D.W. and Carpenter, S.J. Ecology of the tree hole breeding mosquitoes of nearctic North America. Ecol. Monogr., 1946, 16, 31-47.

- Jones, C., and Lloyds, J.E. Efficacy of Bacillus thuringiensis (H-14) for larval Aedes mosquito control in intermountain meadows in Wyoming. J. Am. Mosq. Control Assoc., 1985, 1, 51-55.
- Karch, S. et Hougard, J.M. Etude comparative au laboratoire du devenir de la matière active et des spores de Bacillus sphaericus souche 2362 et de Bacillus thuringiensis sérotype H-14 en milieu aqueux. Cah. O.R.S.T.O.M., ser. Ent. méd. et Parasitol., 1986, 24, 175-179.
- Kellen, W.R., and Lewallen, L.L. Reponse of mosquito larvae of Bacillus thuringiensis Berliner. J. Insect Pathol., 1960, 2, 305-307.
- Khalig, P. One dimensional transient model for short term prediction on downstream pollution in rivers. Waters Research, 1978, 13, 1311-1316.
- Krywienczyk, J., Dulmage, H.T., and Fast, P.G. Occurence of two serologically distinct groups within Bacillus thuringiensis serotype 3ab var. kurstaki. J. invertebr. Pathol., 1978, 36, 372-375.
- Krywienczyk, J. and Fast, P.G. Serological relationships of the crystals of Bacillus thuringiensis var. israelensis. J. invertebr. Pathol. 1980, 31, 139-140.
- Kurtak, D.C. Efficiency of filter feeding of Black fly larvae (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool., 1978, 56, 1608-1623.

- Lacey, L.A., Escaffre, H., , Phillipon, B., Seketeli, A., and Guillet, P.
Large river treatment with Bacillus thuringiensis (H-14) for the control of Simulium damnosum s.l. in the Onchocerciasis Control Programm. Tropenmed Parasit, 1982, 33, 97-101.
- Lacey, A.L., and Undeen, A. Effect of formulation concentration and application time of the efficacy of Bacillus thuringiensis (H-14) against black fly (Diptera: Simuliidae) larvae under natural conditions . J. Econ. Entomol., 1984, 77, 412-418.
- Lacey, L.A., Urbina, M.J., and Heitzman, H. Sustained release formulation of Bacillus sphaericus and Bacillus thuringiensis H-14 for control of container-breeding Culex quinquefasciatus. Mosq. News, 1984, 44, 26-32.
- Lacey, L.A., Heitzman, C.M. Efficacy of flowable concentrate formulation of Bacillus thuringiensis var. israelensis against black flies (Diptera: Simuliidae). J. Am. Control Assoc., 1985, 1, 493-497.
- Lecadet, M.M. Isolement et caractérisation de deux protéases des chenilles de Pieris brassicae L. et étude de leur action sur l'inclusion parasporale de Bacillus thuringiensis. Thèse Doct. Sc. 1965 <<Au Manuscrit>> éd., 10, Rue Paul-Bert, Alfort.
- Lecadet, M.M., Chevrier, G., and Debonder, R. Analysis of the protein fonction in the spore coat of Bacillus thuringiensis. Comparaison with crystal protein. Europ. J. Biochem., 1972, 25, 349-358.

- Lacoursière, J. Etude des principaux facteurs influençant la pathogénécité de Bacills thuringiensis serovar. israelensis envers les larves des mouches noires (Diptères: Simuliidae). Mémoire de maîtrise Dép. Chimie-Bio. U.Q.T.R., 1985, pp. 191.
- Larget, I., de Barjac, H. Activité comparée de 22 variétés de Bacillus thuringiensis sur 3 espèces de Culicidae. Entomophaga, 1981, 26, 143-148.
- Lilles, M.U., and Dunn, P.H. Preliminary laboratory results of the susceptibility of Aedes aegypti (Linneaus) to Bacillus thuringiensis Berliner. Ibid., 1959, 1, 309-310.
- Lüthy, P., et Ebersold, R. The entomodical toxins of Bacillus thuringiensis. Pharmac. Theor., 1981, 13, 257-283.
- Lüthy, P., Jacquet, F., Hubert-Lukac, H.E., Hubert-Lukac, M. Physiology of the delta endotoxin of Bacillus thuringiensis including the ultrastructure and histopathological studies. F. Michal (Ed.) Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases, 1982, 29-36.
- Margalit, J., and Dean, D. The story of Bacillus thuringiensis var. israelensis. J. Am. Mosq. Control. Ass., 1985, 1, 1-6.
- Marjori, G., and Ali. Laboratory and field evaluations of formulations of Bacillus thuringiensis serovar. israelensis against some mosquitoes species of central Italy. J. Invert. Pathol., 1984, 43, 316-323.

- Mc Laughlin, R.E., Dulmage, H.T., Alls, R., Couch, T.L., Dame, D.A., Hall, I.M., Rose, R.I. and Versoi, P.L. U.S. standard bioassay for potency assessment of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquito larvae. Bull. Ent. Soc. Am., 1984, 30, 26-29.
- Miura, T., Takahashi, R.L., and Mulligan, F.S. Effects of the bacterial mosquito larvicide Bacillus thuringiensis serotype H-14 on selected aquatic organisms. Mosq. News, 1980, 40, 619-622.
- Molloy, D., and Jamnback, H. A larval black fly control field trial using mermithid parasites and its cost implications. Mosq. News, 1977, 37, 104-108.
- Molloy, D., Gaugler, R., Jamnback, H. Factors influencing efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis as biological control of black fly larvae. J. Agric. Entomol., 1981, 74, 61-64.
- Molloy, D. and Jamnback, H. Field evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis as a black fly biocontrol agent and its effects on non target stream insects. Mosq. News , 1981a, 37, 104-108.
- Molloy, D. and Jamnback, H. Screening and evaluation of Bacillus thuringiensis sphaericus and Bacillus thuringiensis serotype H-14 as black fly control agents. Ann. Rep. to W.H.O., 1981b, p. 25.
- Molloy, D., Wraight, S.P., Kaplan, B., Gerardi, J., and Peterson, P. Laboratory evaluation of commercial formulation of Bacillus

- thuringiensis var. israelensis against mosquito and black fly larvae. J. Agric. Entomol., 1984, 1, 161-168.
- Morin, A., Back, C., Chalifour, A., Boisvert, J. and Peters, R.H. Effect of black fly ingestion and assimilation on seston transport in a Québec Lake outlet. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 1988 (in press).
- Mulla, M.S., Federici, B.A., and Darwazeh, H.A. Effectiveness of the bacterial pathogen Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquito larvae. Mosq. Vector Contr. Assoc., 1980, 48, 25-27.
- Mulla, M.S., Federici, B.A., Darwazeh, H.A., and Ede, L. Field evaluation of the insecticide Bacillus thuringiensis serotype H-14 against floodwater mosquitoes. Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43, 1288-1293.
- Norusis, M.J. Introductory Statistics Guide SPSSX. Mc Graw-Hill Book Company, 1983, pp. 276.
- Olejnicek, J., and Weisser, J. The efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis against larvae of black fly Odagmia ornata (MEIG.) (Simuliidae) at low temperatures. Folia parasitologica (Praha), 1985, 32, 271-277.
- Ramoska, W.A., and Pacey, C. Food availability and period of exposure as factors of Bacillus sphaericus efficacy on mosquito larvae. J. Eco. Entomol., 1979, 72, 523-525.

- Ramoska, W., Mc Collum, A.W., Quickenden, L.K., and Seckinger, A. Field tests of two commercial formulations of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against Aedes mosquito larvae in Montana pastureland. Mosq. News, 1982, 42, 251-254.
- Ramoska, W.A., Watts, S. and Rodriguez, R.E. Influence of suspended particulates on the activity of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquitoes larvae. J. Econ. Entomol., 1982, 75, 1-4.
- Rishikesh, N and Quelenec, G. Introduction to a standardized method for the evaluation of the potency of Bacillus thuringiensis serotype H-14 based products. WHO document, 1983, 61, 93-97.
- Ross, D.H. et Craig, D.A. Mechanisms of fine particle capture by larvae black flies (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool., 1980, 58, 1186-1192.
- Sandler, N., Zomper, R., Keynan, A., and Margalit, J. Bacillus thuringiensis var. israelensis crystal hemolysis as a possible basis for an assay of larval toxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 23, 47-53.
- Shaddock, J.A. Bacillus thuringiensis serotype H-14. Maximum challenge and eye irritation safety tests in mammals. WHO document W.H.O., 1980, VBC/80, pp. 12.
- Shaikh, M.U., and Morrison, F.O. Susceptibility of nine insect species to infection by Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. J. invertebr. Patholol., 1966, 8, 347-350.

- Sinègre, G. Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant les formulations expérimentales et commerciales du sérotype H-14 de Bacillus thuringiensis. 2. Influence de la température du chlore résiduel, du pH et de la profondeur de l'eau sur l'activité biologique d'une poudre primaire. Cahier O.R.S.T.O.M. entomologie médicale et parasitologie, 1981, 19, (n°3), 149-155.
- Singer, S.S. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. Nature, 1973, 244, 110-111.
- Smith, R.A., and Ulrch, J.T. Enzyme-linked immunosorbant assay for quantitative detection of Bacillus thuringiensis crystal protein. Appl. Environ. Microbiol., 1983, 45, 586-590.
- Talalaev, E.V. Septikamie der Raupen des sibirischen Awenspienners. Microbiol. Moskava, 1956, 25, 99-102.
- Temeyer, B.K., Haugler, M. and Pruett, H.P. Development of an Improved ELISA for Antibody Detection and Use in Production of a Hybridoma Secreting a monoclonal Antibody Specific for Crystal Protein of Bacillus thuringiensis spp. israelensis. J. Eco. Entomol., 1986, 79, 1278-1293.
- Thomas, W.E. and Ellar, D.J. Bacillus thuringiensis var. israelensis crystal delta endotoxin effects in insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J. Cell. Sc., 1982, 60, 181-197.

- Toumanoff, C., and Le Coroller, Y. Contribution à l'étude de Bacillus cereus Frank. et Frank., cristallophores et pathogènes pour les larves de lépidoptères. Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, 680-688.
- Tyrell, D.J., Davidson, L.I., Bulla, Jr. L.A., Ramoska, W.A. Toxicity of parasporal crystals of Bacillus thuringiensis to mosquitoes. Appl. Environ. Microbiol. 1979, 38, 546-658.
- Umino, T., Suzuki, T. and Ochoa A, J.O. Insecticide studies in vector control of Guatemala onchocerciasis. I: Short carry of temephos in minute streamlets. Jpn. J. Sanit. Zool, 1983, 34, 213-219.
- Undeen, A.H., and Nagel, W.L. The effect of Bacillus thuringiensis ONR-60A strain (Golberg) on Simulium larvae in laboratory. Mosq. News, 1978, 40, 181-184.
- Undeen, A.H., and Berl, D. Laboratory studies on the effectiveness of Bacillus thuringiensis var. israelensis de Barjac against Simulium damnosum (Diptera: Simuliidae) larvae. Mosq. News, 1979, 39, 742-745.
- Undeen, L.A., Colbo, M.H. The efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) in their natural habitat. Mosq. News, 1980, 40, 181-184.
- Undeen, A.H., Takaoka, H., and Hansen, K. A test of Bacillus thuringiensis var. israelensis de Barjac as a larvicide for ochraeceum, the central American vector of onchocerciasis. Mosq. News, 1981, 41 37-40.

- Undeen, A.H. and Lacey, L.A. Field procedures for the evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis (sertotype 14) against black flies (Diptera: Simuliidae) and non-target organisms in streams. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am., 1982, 12, 25-30.
- Undeen, A.H., Lacey, L.A. and Avery, S.W. A system for recommending dosage of Bacillus thuringiensis (H-14) for control of simuliidae larvae in small streams based upon stream width. Mosq. News, 1984, 44, 553-559.
- Van Essen, F.W., and Hembree, S.C. Laboratory bioassay of Bacillus thuringiensis against all instars of Aedes aegypti of Aedes taeniorhynchus larvae. Mosq. News, 1980, 40, 424-431.
- Visser, B., van Workum, M., Dulleman, A. and Waalwijk, C. The mosquitocidal activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis is associated with 230 000 and 130 000 crystal proteins. FEMS Microbiology Letters, 1986, 30, 211-214.
- Weiser, J., and Vankova, J. Toxicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis for black flies and other freshwater invertebrates. In Weiser J. Proceedings of the International Colloquium of Invertebrate Pathology (Prague, Czech), 1979, 243-244.
- Wie, S.I., Andrews Jr., S.I., Hammock, B.D., Faust, R.M., and Bulla, L.A. Enzyme Linked immunosorbent assays for detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of Bacillus

thuringiensis subsp. kurstaki and israelensis. Appl. Environ. Microbiol. 1982, 43, 891-894.

Wotton, R.S. Evidence that black fly larvae can feed on particules of colloïdals size. Nature, 1976, 261-697.

Wraight, S.P., Molloy, D., Jamnback, H. and Mc Coy, P. Effet of temperature and instar on the efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis and Bacillus sphaericus 1953 against Aedes stimulans larvae. J. Invertebr. Pathol., 1981, 38, 78-87.

Yamamoto, T. Identification of entomocidal toxins of Bacillus thuringiensis by high performance liquid chromathography. J. Gen. Microbiol., 1983, 129, 2595-2603.